

Neue PCT-Anmeldung  
Selecore GmbH  
u. Z.: H2768 PCT S3

**Verfahren zur Identifizierung von Enzymen mit gewünschten Eigenschaften  
durch Verankerung der Reaktionsprodukte auf der Oberfläche Enzym-  
präsentierender Organismen**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von Enzymen mit einer gesuchten Aktivität durch die zufallsmäßige Erzeugung einer großen Sammlung von Enzymvarianten, die Synthese dieser Varianten in Wirtsorganismen, deren Präsentation auf der Oberfläche der Organismen und die Isolierung von Enzymvarianten mit den gewünschten Eigenschaften durch den Nachweis der kovalenten Deposition des Reaktionsproduktes auf der Oberfläche des Wirtsorganismus.

Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Identifizierung von Hydrolasen mit gewünschten Eigenschaften, wobei Hydrolasevarianten auf der Oberfläche von Organismen präsentiert werden, welche mit einem zweiten Enzym, das als Hilfsenzym wirkt, dekoriert werden. Das von der Hydrolase freigesetzte Produkt ist seinerseits Substrat für das Hilfsenzym, welches das Produkt aktiviert, so dass dieses durch Kopplung an funktionelle Gruppen auf der Oberfläche des Wirtsorganismus kovalent fixiert wird. Durch die Fixierung des Produktes wird der Wirtsorganismus, der die gewünschte Enzymaktivität aufweist, markiert und kann dann aus einer großen Sammlung von Organismen, die verschiedene Hydrolasevarianten exprimieren, isoliert werden. Dieses Verfahren eignet sich insbesondere zur Durchmusterung großer Bibliotheken und erlaubt es, in kurzer Zeit mehrere Millionen Enzymvarianten zu testen und damit schneller und zielgerichteter als bisher möglich zu Enzymvarianten mit gewünschten Eigenschaften zu kommen.

Hydrolytische Enzyme und insbesondere Esterasen und Lipasen repräsentieren eine Klasse von Enzymen, die unverzichtbares Hilfsmittel für eine Vielzahl von Anwendungen in der organischen Chemie und Biotechnologie geworden sind. Ihr Potenzial beruht auf ihrer Fähigkeit, nicht nur die Hydrolyse, sondern auch die

BEST AVAILABLE COPY

Synthese vieler verschiedener Ester zu katalysieren, welche üblicherweise mit hoher Spezifität und Selektivität erfolgt. Lipasen (EC 3.1.1.3) sind Carboxylesterasen, die die Fähigkeit besitzen langkettige Acylglycerylester ( $>C_{10}$ ) zu hydrolysieren, während Esterasen (EC 3.1.1.1) Estersubstrate kürzerkettiger Fettsäuren hydrolysieren ( $<C_{10}$ ).

Hydrolasen, darunter vor allem Lipasen und Esterasen, werden in der Biotechnologie vor allem für die Katalyse stereoselektiver Konversionen einer Vielzahl von Aminen, sowie primären und sekundären Alkoholen eingesetzt (Rogalska et al., Biochem. Soc. Trans. 25 (1997), 161-164; Jaeger et al., FEMS Microbiol. Rev. 15 (1994), 29-63). Jedoch ist nicht für jede gewünschte Umsetzungsreaktion eine entsprechend selektive Hydrolase bekannt. Daher wurden neue Wege beschritten, Hydrolasemutanten aus natürlichen Quellen zu isolieren oder bekannte Hydrolasen so abzuwandeln, dass sie den geforderten Ansprüchen an die Selektivität und Spezifität für den kommerziellen Einsatz genügen.

Selektion, d.h. Zellkultivierung unter Bedingungen, die eine Zellvermehrung nur erlauben, wenn ein bestimmtes Enzym aktiv ist, war viele Jahre das Mittel der Wahl, um Enzyme mit gewünschten Eigenschaften zu isolieren. Das bisher erfolgreichste Verfahren beruht auf der Mutagenese eines Gens *in vitro*, welches für ein gewünschtes Enzym kodiert, der Einführung der mutagenisierten DNA in Zellen, um eine Bibliothek zu generieren, und schließlich der Selektion von Zellen, die ein aktives Enzym produzieren, durch Anlegen restriktiver Wachstumsbedingungen. So konstruierten z.B. Palzkill et al. (J. Bacteriol. 176 (1994), 563-568) Sammlungen großer Bibliotheken, bei denen mehrere Aminosäuren umfassende Sequenzabschnitte in beta-Lactamase durch den Einsatz von *in vitro* Techniken randomisiert wurden. Die beta-Lactamase Mutantengene wurden durch Transformation in *E. coli* eingebracht. Zellen, die in der Lage waren, in Gegenwart von beta-Lactam-Antibiotika zu wachsen, welche normalerweise schlechte Substrate für beta-Lactamase sind, wurden isoliert (Venkatachalam et al., J. Biol. Chem. 269 (1994), 23444-23450).

Ein Vielzahl von Techniken einschließlich chemischer Mutagenese isolierter DNA, Genamplifikation durch "Error prone" PCR und Oligonucleotid-Mutagenese wurden eingesetzt, um Bibliotheken von Mutanten-Genen zu generieren, die eine gewünschte Anzahl von Nukleotidsubstitutionen aufweisen. Häufig werden mehrere

Runden von Selektion und Mutagenese angewandt, um zunehmend verbesserte Enzyme zu selektieren.

Die Selektion verbesserter Enzyme, die in vitro konstruierten Gen-Bibliotheken entstammen, ist ein leistungsfähiges Verfahren, um Enzyme mit gewünschten Eigenschaften zu erhalten. Dieses kann allerdings nur dann eingesetzt werden, wenn das gesuchte Enzym eine essentielle und für das Überleben der Zelle notwendige Reaktion katalysiert. Leider ist es für eine Vielzahl kommerziell interessanter enzymkatalysierter Reaktionen nicht möglich, eine Selektionsstrategie zu entwickeln.

Für Enzymreaktionen, bei denen das Design einer Selektionsstrategie nicht möglich ist, müssen Bibliotheken von Mutanten durch Anwendung eines direkten Assays durchgemustert werden. Dabei wird wiederum durch Einführung von Mutationen im Gen des entsprechenden Enzyms eine Sammlung von Enzymgenen erzeugt. Durch individuelles Einbringen dieser Gene, üblicherweise im Kontext eines Expressionsplasmids, in einen mikrobiellen Expressionswirt wird damit eine Population von Mikroorganismen generiert, von denen jeder Klon im Prinzip eine bezüglich der Aminosäuresequenz variierte Enzymvariante synthetisiert. Die einzelnen Klone werden dann separat vermehrt, entweder als Kolonien auf Agarplatten oder in 96-Loch Platten. Die Wirtszellen werden lysiert und damit wird die Enzymvariante freigesetzt. Jedes einzelne Lysat wird nun mit einem vorgegebenen - häufig chromogenen - Substratmolekül inkubiert und die Umsatzreaktion vermessen. Solche Mikroorganismen, die eine Enzymvariante produzieren, welche gewünschte Verbesserungen in Hinblick auf die gesuchten enzymatischen Eigenschaften aufweist, werden anschließend vermehrt. Durch Gewinnung der für die Enzymvariante kodierenden Gensequenz und Bestimmung der Basenabfolge des gegenüber dem Wildtyp veränderten Gens kann die erhaltene Variante bezüglich ihrer Abweichungen von der Basenabfolge des ursprünglich eingesetzten Gens charakterisiert werden. Durch Anwendung dieser Strategie konnten z.B. Moore und Arnold (Nature Biotechnol. 14 (1996), 458-467) eine Variante der p-Nitrobenzylesterase isolieren, welche in 30% DMF eine 16-fach höhere Aktivität aufwies als das Ausgangsenzym.

Üblicherweise zeigt die aus einer einzigen Runde von Mutagenese und Screening erhaltene Enzymvariante zwar leichte Verbesserungen ihrer enzymatischen Eigenschaften in Richtung auf die gewünschte, prägt jedoch die gewünschte Eigenschaft noch nicht vollständig aus. Daher wird meistens ausgehend von dieser

erhaltenen Enzymvariante ein neuer Satz von Genvarianten erzeugt, und mit diesen der Prozess von Genexpression in Mikroorganismen, Bestimmung der enzymatischen Eigenschaften individueller Klone und Identifizierung von in Hinblick auf die gewünschten Eigenschaften verbesserten Varianten erneut durchlaufen, solange bis die gewünschte Eigenschaft erhalten wird.

Dieses Verfahren birgt jedoch einen wesentlichen Nachteilen in sich: Es erfordert eine physikalische Separierung und Kultivierung in räumlich getrennten Kulturgefäßen (z.B. Mikrotiterplatten oder Reagensgläser) der einzelnen mikrobiellen Klone, welche zufallsmäßig veränderte Gene für das Enzym tragen und damit auch unterschiedliche Enzymvarianten produzieren. In jedem einzelnen der getrennten Kulturgefäße muss dann die enzymatischen Eigenschaft der von dem jeweiligen mikrobiellen Klon produzierten Enzymvariante gemessen werden. Dieses Verfahren ist in Bezug auf die dadurch notwendige getrennte Handhabung der mikrobiellen Klone und der getrennten Bestimmung der enzymatischen Eigenschaften jedes einzelnen mikrobiellen Klonen sehr aufwändig. Aus Gründen der Logistik und der Kosten kann damit immer nur ein Subsatz der tatsächlich erzeugten Genvarianten durchgemustert werden. Üblicherweise werden mehrere hundert bis mehrere 1000 Klone wie oben beschrieben in Hinblick auf die gesuchte Eigenschaft untersucht. Die Vielfalt der tatsächlich erzeugten Genvarianten ist demgegenüber aber wesentlich höher und kann über  $10^9$  liegen. Es ist jedoch sehr wünschenswert, möglichst viele Enzymvarianten untersuchen zu können, da sonst das Risiko besteht, dass eine Variante mit besonders günstigen Eigenschaften unentdeckt bleibt, weil sie nicht zum Ensemble der untersuchten Enzymvarianten gehört.

Das Screening von Kolonien unter Anwendung von Platten-Assays unterliegt außer der Tatsache, dass nur eine begrenzte Anzahl von Screening-Reaktionen durchgeführt werden kann, weiteren Einschränkungen: Da die weitaus größte Anzahl von Proteinen von *E. coli* - welches der am besten geeignete Wirtsorganismus für gelenkte Evolution ist - nicht freigesetzt werden, muss das Substrat in der Lage sein, in die Zellen zu diffundieren und es darf nicht toxisch sein. Außerdem zeigen Platten-Assays, auch solche, für die fluoreszierende Moleküle benutzt werden, häufig eine moderate Spezifität.

Es besteht daher die Tendenz Ultra-Hochdurchsatzverfahren zu entwickeln, die (1) in kleinem Reaktionsmassstab arbeiten, (2) eine schnelle Messung der enzymatischen

Eigenschaften jedes einzelnen Klonen einer mikrobiellen Population ermöglichen und mit der (3) weit mehr als die mit dem Stand der Technik mögliche Anzahl von Klonen bearbeitet werden kann. Wünschenswert ist dabei, dass die zur Testung anstehende Enzymvariante vom mikrobiellen Produzenten nicht nur synthetisiert, sondern freigesetzt wird, so dass eine direkte Interaktion mit dem Substrat stattfinden kann und außerdem nahezu beliebige Reaktionsbedingungen in Hinblick auf Wahl des Lösungsmittels, pH, Ionenkonzentration etc. geschaffen werden können.

Angestrebt wird ferner, das zu untersuchende Enzym außerhalb der produzierenden Zelle in einer Form zur Verfügung zu stellen, dass es mit der Oberfläche der produzierenden Zelle kovalent verknüpft ist. In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe von Screening-Verfahren zur Isolierung von Enzymen mit verbesserten Eigenschaften entwickelt, die das Ziel haben, die Beschränkungen von Platten-Assays aufzuheben und die auf der Durchmusterung Oberflächen-exponierter Enzymbibliotheken beruhen. Vielleicht die innovativste Anwendung wurde am Beispiel der Protease OmpT aus *Escherichia coli* beschrieben (Olsen *et al.*, Nat. Biotechnol. 18 (2000), 1071-1074). Dort wurde mit OmpT eine Protease aus *Escherichia coli* eingesetzt, die von sich aus ein Protein der äußeren Membran ist und damit in der äußeren Membran von *E. coli* verankert ist und eine Protease-Domäne auf der Außenseite der bakteriellen Oberfläche exponiert. Es wurde eine zufallsmäßige Sammlung von *ompT* Genvarianten erzeugt. Die operativ mit diesen verknüpften *ompT*-Varianten wurden exprimiert und die jeweilige variante enzymatische Proteindomäne auf der Oberfläche der jeweiligen, diese produzieren Bakterienzelle exponiert. Die Bakterienzellen wurden mit einem synthetischen Peptid inkubiert, welches zwei räumlich benachbarte Fluorophore trägt. Durch hydrolytische Spaltung - hervorgerufen durch eine OmpT-Variante mit der gewünschten Substratspezifität - des Peptides kommt es zur Separierung der Fluorophore und damit zu einer Änderung der Fluoreszenzeigenschaften des Produktes gegenüber dem Substrat, welches dann eine erhöhte grüne Fluoreszenz zeigt. Das freigesetzte Produkt weist eine positive Nettoladung auf, so dass es auf der (negativ geladenen) Oberfläche derjenigen Zelle, die eine Proteolyseaktivität gegenüber dem Substrat aufweist, gebunden bleibt. Damit war es möglich, durch Durchflußzytometrie grün-fluoreszierende Zellen zu isolieren, bei denen die beobachtete grüne Fluoreszenz mit einer katalytischen Aktivität der oberflächenexponierten OmpT-Proteasevariante korrelierte. Ein wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens besteht jedoch darin, dass

das durch Umsatz mit dem Enzym freigesetzte Reaktionsprodukt lediglich durch ionogene Wechselwirkungen, auf der Oberfläche der das Substrat konvertierenden Bakterienzelle gebunden ist. Damit ist eine gewünschte permanente Kopplung des Phänotyps der enzymatischen Aktivität mit dem korrespondierenden Genotyp der diese Aktivität ausprägenden Bakterienzelle nicht gegeben. Es besteht stets das Risiko, dass sich Produktmoleküle von der Oberfläche der sie generierenden Bakterienzelle ablösen, damit in Lösung freigesetzt werden und damit auf der Oberfläche anderer, nicht die gewünschte enzymatische Aktivität ausprägende Bakterien binden. Dadurch wird eine Identifizierung der Bakterien, die die gewünschte Enzymaktivität exprimieren, durch Nachweis der gebundenen Produktmoleküle erheblich erschwert. Außerdem bleibt die Bindung des Produktes an die Zelloberfläche nur unter Niedrigsalzbedingungen erhalten und das Verfahren ist nur dann anwendbar, wenn das erhaltene Produkt eine Ladung aufweist und wenn diese Ladung gegensätzlich zu der Ladung der Oberfläche der Wirtszelle ist. Darüber hinaus ist es nur auf solche Mikroorganismen anwendbar, die eine geladene Oberfläche besitzen. Ferner kann das Verfahren nicht eingesetzt werden, wenn sich die auf dem Substrat- oder Produktmolekül befindliche Ladung in ungünstiger Weise auf die Enzymreaktion auswirkt.

Es besteht daher der Bedarf, Verfahren zur Isolierung von Enzymen, insbesondere von solchen mit Substrat-spaltender Aktivität, mit gewünschten Eigenschaften zur Verfügung zu stellen, die einen extrem hohen Durchsatz erlauben und eine einfache und zuverlässige Bestimmung positiver Klone erlauben.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, derartige Verfahren zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung eines Enzymes mit einer gewünschten Substrat-spaltenden Aktivität, wobei eine Bibliothek, die eine Vielzahl verschiedener Kandidatenpolypeptide kodiert, derart von geeigneten Wirtsorganismen exprimiert wird, dass die Kandidatenpolypeptide auf der Oberfläche der Wirtsorganismen präsentiert werden, und die Wirtsorganismen mit dem zu spaltenden Substrat in Kontakt gebracht werden, dadurch gekennzeichnet, dass

- (a) auf der Oberfläche der Wirtsorganismen ein Hilfsenzym bereitgestellt wird, welches die Ausbildung einer kovalenten Bindung ermöglicht zwischen der Oberfläche des Organismus und einem Produkt, das durch die Substratspaltungs-Reaktion entsteht, die durch ein Kandidatenpolypeptid katalysiert wird, und
- (b) die Wirtsorganismen identifiziert werden, bei denen das Produkt auf der Oberfläche gebunden ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist besonders vorteilhaft, da es die kovalente Bindung eines Produktes der durch das Kandidatenpolypeptid katalysierten Reaktion auf der Oberfläche der Wirtsorganismus ermöglicht. Dadurch wird die Verlässlichkeit, mit der Wirtsorganismen, die die gewünschte Enzymaktivität exprimieren, identifiziert werden können, drastisch erhöht. Die kovalente Fixierung des Reaktionsproduktes an der Oberfläche des Wirtsorganismus erlaubt eine bessere Korrelation zwischen der Detektion der gewünschten Enzymaktivität und dem Wirtsorganismus, der diese Enzymaktivität exprimiert. Die Nachteile der im Stand der Technik beschriebenen Verfahren, bei denen das Reaktionsprodukt über ionische Wechselwirkungen an die Zelloberfläche einer Wirtszelle gebunden wird, werden vermieden. Das erfindungsgemäße Verfahren ist darüber hinaus sehr breit anwendbar, d. h. auf alle möglichen Enzymaktivitäten und Substrate, da keine Rücksicht auf die Ladungsverhältnisse des Substrats bzw. des verwendeten Wirtsorganismus genommen werden müssen.

Der Ausdruck „Enzym“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Polypeptid, das in der Lage ist, eine biochemische Reaktion zu katalysieren. Das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung kann eingesetzt werden für die Identifizierung von Enzymen mit Substrat-spaltender Aktivität. Der Ausdruck „Substrat-spaltend“ bedeutet dabei, dass das Enzym eine Reaktion katalysiert, durch die ein vorgegebenes Substrat (Edukt) in mindestens zwei Produkte gespalten wird. Reaktionen, die zur Spaltung eines Edukts durch ein Enzym in mindestens zwei Produkte führen sind beispielsweise Hydrolyse, Phosphorolyse oder Eliminierung. Phosphorolyse ist dabei die Spaltung einer Bindung durch Orthophosphat. Hydrolyse bezeichnet eine Reaktion, bei der die Spaltung einer Bindung durch Wasser erfolgt, wobei eine OH-Gruppe in ein Produkt der Spaltungsreaktion und ein Wasserstoffatom in das andere Produkt inkorporiert wird. Eliminierung bezeichnet

eine Reaktion bei der zwei Substituenten eines Paares benachbarter Atome in einem Molekül entfernt werden, ohne dass ein Ersatz durch andere Atome oder Gruppen erfolgt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens weist daher das Enzym mit Substrat-spaltender Aktivität Hydrolase-Aktivität auf, d. h. es ist in der Lage eine Hydrolysereaktion zu katalysieren. Beispiele für Enzyme mit Hydrolase-Aktivität sind Esterasen, Lipasen, Phosphatasen, Glucosidasen, Acylasen oder Amidasen. Phosphatasen sind Hydrolasen, durch die Phosphosäuremonoester z. B. von Zuckerphosphaten, Nucleosidmonophosphaten oder als terminale Phosphatgruppe von Nukleinsäuren hydrolytisch abgespalten werden. Je nach dem pH-Wert, in dem diese Enzyme ihre optimale Wirksamkeit entfalten, unterscheidet man zwischen sauren Phosphatasen und alkalischen Phosphatasen. Glucosidasen sind Hydrolasen, die glykosidisch gebundene Glukose abspalten. Amidasen katalysieren die hydrolytische Spaltung von Amiden. Acylasen sind Enzyme, welche in der Lage sind, die Abspaltung von Acylgruppen aus einem Molekül zu katalysieren. Dazu gehören z. B. Deacylasen, aber auch Lipasen.

Lipasen (E.C. 3.1.1.3) sind Carboxylesterasen, die die Fähigkeit besitzen, langkettige Fettsäureester ( $\geq C_{10}$ ) zu hydrolysieren. Esterasen (E.C. 3.1.1.1) besitzen dagegen die Fähigkeit, Estersubstrate kürzerkettiger Fettsäuren zu hydrolysieren ( $\leq C_{10}$ ). Hierzu gehören zum Beispiel biotechnologisch wichtige Lipasen und Esterasen, wie Phospholipasen (Lederverarbeitung), Acylasen aus *B. megaterium* und *E. coli* (chemische Synthese), Lipase aus *Aspergillus* sp. (Prostaglandinsynthese), LipA aus *B. subtilis* (Cephalosporinsynthese), Lipase aus *Candida* sp. (Pyrolidinionsynthese), Lipase aus *C. rugosa* (Synthese von Ibuprofen), aus *Chromobacterium* (Vitamin D Synthese), aus *M. miehei* (Synthese von Ketoprofen), aus *P. cepacia* (Rapamycinsynthese), aus *P. fluorescens* (Synthese von Hydantoinen) und aus *Streptomyces* sp. (Synthese von Penicillinen).

Vorzugsweise ist das Enzym mit Esteraseaktivität abgeleitet von einer Esterase aus einem prokaryontischen Organismus, vorzugsweise einem Bakterium, besonders bevorzugt einem Bakterium der Gattung *Pseudomonas* und ganz besonders bevorzugt aus der Species *Pseudomonas aeruginosa*. Insbesondere bevorzugt ist die Esterase abgeleitet von der Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa*. Beschrieben ist dieses Enzym beispielsweise in Wilhelm et al. (J. Bacteriol. 181



(1999), 6977-6986). Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der EstA Esterase sind in Figur 4 gezeigt.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist das Enzym mit Lipaseaktivität abgeleitet von der Lipase LipA aus *Bacillus subtilis* (Eggert et al., *Eur.J. Biochem.* 267 (2000), 6459-6469; Van Pouderoyen et al., *J. Mol. Biol.* 309 (2001), 215-216; Eggert et al., *FEBS Lett.* 502 (2001), 89-92; Eggert et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 225 (2003), 319-324).

Das Substrat, das in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt wird und für das ein Enzym mit entsprechender Substrat-spaltender Aktivität gesucht wird, kann im Prinzip jedes beliebige Substrat sein, das durch ein Enzym spaltbar ist. Das Substrat wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren so gewählt, dass es durch die gewünschte zu identifizierende Enzymaktivität gespalten wird. Ferner sollte dabei sicher gestellt sein, dass das Substrat lediglich der gewünschten, zu identifizierenden Enzymaktivität als Substrat dient, nicht jedoch dem gleichzeitig auf der Oberfläche des Wirtsorganismus bereitgestellten Hilfsenzym. Vorzugsweise ist es ein Substrat, das durch eine durch ein Enzym katalysierte Reaktion hydrolytisch spaltbar ist, besonders bevorzugt ist das Substrat ein Ester. Wird in dem Verfahren versucht, ein Enzym zu identifizieren, das eine Esterase oder eine Lipase ist, so ist das Substrat vorzugsweise ein Ester kürzerkettiger Fettsäuren ( $\leq C_{10}$ ) oder ein Derivat eines solchen Esters bzw. ein langkettiger Fettsäure ( $\geq C_{10}$ ) oder ein Derivat eines solchen Esters. Beispiele für Derivate sind z. B. halogenierte Fettsäuren, verzweigt-kettige Fettsäuren, Aminosäuren oder Hydroxysäuren und viele andere.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens hat das Enzym Esterase- bzw. Lipaseaktivität und das Substrat ist ein Phenolderivat eines Esters beliebiger Carbonsäuren, d. h. ein Phenolester.

Das Substrat weist bevorzugt einen Bestandteil auf, der nach Spaltung durch die gewünschte Enzymaktivität zu einem Produkt führt, das durch das Hilfsenzym in eine aktivierte Form überführt werden kann, die dann mit Gruppen auf der Oberfläche des Wirtsorganismus eine kovalente Bindung eingeht. Solche Bestandteile sind dem Fachmann bekannt, z. B. aus dem US-Patent 5,196,306, und umfassen beispielsweise Tyramin und p-Hydroxyphenylpropionylbiocytin. Im Fall eines Esters kann z. B. die Alkoholkomponente nach Spaltung durch eine Esterase durch das Hilfsenzym in ein Radikal überführt werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens trägt das einzusetzende Substrat einen Bestandteil, der den Nachweis eines Produkts der Substratspaltungsreaktion erlaubt. Beispiele für einen solchen Bestandteil sind in der Molekularbiologie routinemäßig eingesetzte Marker, die einen Nachweis erlauben, wie z. B. Fluoreszenzmarker, Chemilumineszenzmarker, radioaktive Marker, Biotin, Avidin, Streptavidin, Antigene für Antikörper, magnetische Partikel oder ein Enzym, dass zu einem nachweisbaren Farbstoff führt bei Kontakt mit einer chromogenen Substanz. Derartige Marker und ihre Verwendungen sind dem Fachmann bekannt und sind im Zusammenhang mit der Identifizierung neuer gewünschter Enzymaktivitäten auch beschrieben in der US-Patentanmeldung 20030036092. Der Bestandteil, der den Nachweis eines Produktes der Substratspaltungsreaktion erlaubt, befindet sich dabei an dem Substrat an einer Komponente, die nach der Spaltungsreaktion durch das Hilfsenzym kovalent auf der Oberfläche des Wirtsorganismus fixiert wird. Wird beispielsweise ein phenolischer Ester als Substrat eingesetzt und eine Peroxidase als Hilfsenzym, so kann in dem phenolischen Ester die Alkoholfunktion mit einem detektierbaren Signalmolekül (in dem angefügten Beispiel Biotin) verknüpft sein. Das durch Hydrolyse des Esters freigesetzte Tyramid, das das Signalmolekül trägt, wird durch die auf der Oberfläche des Wirtsorganismus fixierte Peroxidase in Gegenwart von  $H_2O_2$  aktiviert. Das Phenolradikal reagiert mit aromatischen Resten auf der Oberfläche des Wirtsorganismus und wird dadurch kovalent fixiert. Die Gegenwart des mit dem Signalmolekül markierten Produktes auf der Oberfläche des Wirtsorganismus kann dann mit dem Fachmann bekannten Detektionsverfahren nachgewiesen werden. Im Fall von Biotin kann der Nachweis z. B. über die Bildung von Biotin/Streptavidin-Konjugaten erfolgen. Das Streptavidin kann beispielsweise mit einem fluoreszierendem Stoff, z. B. R-Phycoerythrin, gekoppelt sein, der den Nachweis von Biotin über die Bildung der Biotin/Streptavidin-Konjugate erlaubt. Zellen, die entsprechende Fluoreszenz-markierte Konjugate auf ihrer Oberfläche aufweisen, können durch Durchflusscytometrie, z. B. durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, identifiziert und isoliert werden.

Alternativ kann auch das Substrat selber mit einem Fluoreszenzfarbstoff verknüpft werden, so dass das auf der Zelloberfläche durch das Hilfsenzym fixierte Produkt fluoreszenzmarkiert ist. Auch in diesem Fall können die fluoreszenzmarkierten Zellen

durch Durchflusscytometrie, z. B. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, identifiziert und isoliert werden.

Erfindungsgemäß wird auf der Oberfläche des Wirtsorganismus, der ein Kandidatenmolekül auf seiner Oberfläche präsentiert, ein „Hilfsenzym“ bereitgestellt. Dieses Hilfsenzym ist in der Lage, eine Reaktion zu katalysieren, welche die kovalente Bindung eines Produktes der Spaltungsreaktion an der Oberfläche des Wirtsorganismus ermöglicht. Vorzugsweise ist das Hilfsenzym ein Enzym, das in der Lage ist, ein durch die Substratspaltungsreaktion freigesetztes Produkt in eine aktivierte Form zu überführen, die in der Lage ist, mit Gruppen, die auf der Oberfläche des Wirtsorganismus vorhanden sind, eine kovalente Bindung einzugehen. Solche Enzyme sind dem Fachmann bekannt und umfassen vorzugsweise jene, die in dem US-Patent 5,196,306 beschrieben sind, dessen Offenbarungsgehalt hiermit durch Bezugnahme in die vorliegende Anmeldung inkorporiert wird. Beispiele für Hilfsenzyme sind somit Peroxidasen, Ligasen, Oxidoreductasen, Transferasen und Isomerasen. Bevorzugt sind Peroxidasen, Oxidasen, z. B. Aminooxidasen, und Transferasen. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Hilfsenzym um eine Peroxidase. Der Begriff Peroxidase bezeichnet allgemein Enzyme, die die Oxidation einer Verbindung mit Peroxid als Oxidationsmittel katalysieren.

Es kann im Prinzip jede beliebige Peroxidase in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden. Beispiele sind Myeloperoxidase (McCormick et al., J. Biol. Chem. 273 (1998), 32030-32037; Myeloperoxidase aus menschlichen Leukozyten wird vertrieben durch Fluka, Sigma-Aldrich), Lactoperoxidase (Heinecke, Toxicology 177 (2002), 11-22; Ost dal et al., J. Agric. Food Chem. 48 (2000), 3939-3944; Lactoperoxidase aus Kuhmilch wird vertrieben durch Fluka, Sigma-Aldrich), Ribonuclease A bei Zusatz von Nickelionen (Gill et al., Chem. Res. Toxicol. 10 (1997), 302-309) und Peroxidase aus Meerrettich (Horseradish-Peroxidase; HRP). Bevorzugt wird Horseradish Peroxidase (HRP) verwendet. Sie ist kostengünstig zu erhalten (z. B. Sigma, Fluka) und hat sich für eine Vielzahl biochemischer Nachweisreaktionen bewährt.

Wie oben erwähnt, ist das Hilfsenzym vorzugsweise in der Lage, ein durch die Substratspaltungsreaktion freigesetztes Produkt in eine aktivierte Form zu überführen, welche in der Lage ist, eine kovalente Bindung mit Gruppen einzugehen,

die auf der Oberfläche des Wirtsorganismus lokalisiert sind. Solche Gruppen auf dem Wirtsorganismus umfassen insbesondere aromatische Reste, wie z. B. die Seitenketten von Tyrosin-, Tryptophan- oder Histidinresten. Unter einer „aktivierten Form“ wird dabei vorzugsweise ein hochreaktives kurzlebiges Reaktionsprodukt verstanden. Eine aktivierte Form kann z. B. ein Radikal sein. Radikale haben den Vorteil, dass sie sehr schnell durch Wassermoleküle deaktiviert werden, wenn sie nicht sofort mit Molekülen auf der Oberfläche des Wirtsorganismus reagieren. Andere aktivierte Formen sind die in dem US-Patent 5,196,306 beschriebenen. Denkbar ist z. B. auch die Verwendung einer Aminooxidase als Hilfsenzym, wenn das durch die Spaltungsreaktion freigesetzte Produkt eine freie Aminogruppe trägt. Die Aminooxidase setzt dann die freie Aminogruppe um zu einem Aldehyd, welches dann auf der Oberfläche des Organismus mit primären Aminen über eine Schiff-Basen-Bildung reagiert und eine kovalente Bindung ausbilden kann.

In analoger Weise können auch andere Oxidasen als Hilfsenzyme eingesetzt werden, die ein in der Spaltungsreaktion freigesetztes Produkt in ein Aldehyd überführen, z. B. Galactoseoxidase, die freigesetzte Galactose zum entsprechenden Aldehyd umwandelt.

Der Ausdruck „auf der Oberfläche des Wirtsorganismus bereitgestellt“ bedeutet, dass das Hilfsenzym an der Oberfläche des Wirtsorganismus vorhanden ist. Das Hilfsenzym kann dabei gemäß bekannter Methoden auf der Oberfläche bereitgestellt werden. Möglich ist z. B. die irreversible oder die reversible Immobilisierung des Hilfsenzym auf der Oberfläche des Wirtsorganismus. Eine irreversible Immobilisierung kann z. B. erreicht werden durch kovalente Bindung des Hilfsenzym an Gruppen, die auf der Oberfläche des Wirtsorganismus vorhanden sind. So ist es möglich, ein Hilfsenzym, insbesondere Peroxidase, dadurch auf der Oberfläche des Wirtsorganismus zu immobilisieren, dass eine Oxidation der Zuckerseitenketten des Proteins mit Natriumperiodat und Schiff-Basereaktion der so erzeugten Zuckeraldehyde mit auf der Oberfläche des Wirtsorganismus vorhandenen primären Aminogruppen durchgeführt wird. Ein solches Verfahren ist z. B. beschrieben in Hermanson (Bioconjugate Techniques (1996); Academic Press, New York). Andere Möglichkeiten zur Erzeugung einer kovalenten Bindung sind dem Fachmann bekannt, z. B. durch den Einsatz von Glutaraldehyd, m-Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccinimidester, Carbodiimide oder bis-diazotiertes Benzidin. Beschrieben

sind diese und andere Verfahren zur Erzeugung kovalenter Bindungen in „Cross-linking techniques“ (Baumert und Fasold, *Methods Enzymol.* 172 (1989), 584-609).

Möglich ist auch die Bindung des Hilfsenzym an die Oberfläche des Wirtsorganismus in Form eines Konjugates aus Hilfsenzym und Rezeptor, wobei der Rezeptor in der Lage ist ein Molekül zu binden, das auf der Oberfläche des Wirtsorganismus vorkommt. Ein Beispiel für einen solchen Rezeptor ist ein Antikörper, der eine Struktur, z. B. ein Protein, auf der Oberfläche des Wirtsorganismus erkennt. Dies kann z. B. ein Konjugat aus dem Hilfsenzym und einem anti-E. coli Antikörper sein, welcher Lipopolysaccharide auf der Zelloberfläche erkennt. Solche Konjugate sind kommerziell erhältlich, z. B. bei Maine Biotechnology Services Inc.. Eine andere Möglichkeit ist ein Konjugat aus einem zuckerbindenden Lektin und einem Hilfsenzym (siehe z. B. Appukuttan et al., *Biochem. Biophys.* 37 (2000), 77-80). Eine weitere Möglichkeit, das Hilfsenzym auf der Oberfläche des Wirtsorganismus zur Verfügung zu stellen besteht darin, dass es von dem Wirtsorganismus exprimiert wird und zwar derart, dass es auf der Oberfläche des Wirtsorganismus präsentiert wird. Verfahren, mit denen dies erreicht werden kann, sind dem Fachmann bekannt und werden weiter unten im Zusammenhang mit der Expression der Kandidatenpolypeptide ausführlich beschrieben.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, ist das zu identifizierende Enzym eine Esterase, das Hilfsenzym eine Peroxidase und das Substrat ist ein Phenolderivat eines Esters beliebiger Carbonsäuren, d. h. ein Phenolester. Solche Phenolester tragen eine funktionelle Gruppe, die den Nachweis der Deposition des Produktes der Esteraseaktivität auf der Oberfläche des Wirtsorganismus ermöglichen. Dabei wird von der bekannten Tatsache Gebrauch gemacht, dass Derivate von Phenol durch Peroxidase in Gegenwart von  $H_2O_2$  durch Bildung eines phenolischen Radikals aktiviert werden, welches mit elektronenreichen Gruppen anderer Moleküle, wie z. B. Tyrosin oder Tryptophanresten, kovalente Addukte bilden. Diese Eigenschaft wurde beispielsweise ausgenutzt, um Präparate immunhistochemisch zu färben (Van Gijswijk et al., *J. Immunol. Methods.* 189 (1996) 117-127; Bobrow et al., *J. Immunol. Methods* 125 (1989), 279-285 ; US Patente 6,593,100, 5,731,158 und 5,196,306 ; EP1129214). Dabei wird Peroxidase mit einem Rezeptor (z. B. einem Antikörper) konjugiert und diese damit über die Rezeptorbindung selektiv platziert. Nicht

gebundenes Konjugat wird abgewaschen. Dann wird ein phenolisches Substratmolekül zugesetzt, welches mit einem Signalmolekül, z. B. mit Biotin, verknüpft ist. Aufgrund der geringen Lebensdauer des durch Peroxidase aktivierten Substrates reagiert dieses in der Nähe des Ortes seiner Bildung ab und fixiert das Biotin kovalent an unmittelbar benachbarten funktionellen Gruppen (Figur 2). Der Phenolester selber ist kein Substrat für die Peroxidase. Somit kann keine Aktivierung des Phenolesters durch die Peroxidase und Deposition auf der Oberfläche des Wirtsorganismus erfolgen. Nur wenn durch die auf der Oberfläche des Wirtsorganismus präsentierte Enzymaktivität die Säurefunktion abgespalten wird und die freie phenolische Komponente vorliegt, ist eine kovalente Bindung der phenolischen Komponente, d. h. eines Reaktionsproduktes der Enzymaktivität, auf der Oberfläche des Wirtsorganismus möglich.

Wie bereits oben beschrieben, kann das Substrat (insbesondere der Teil, der nach der Spaltungsreaktion als Produkt durch das Hilfsenzym auf der Oberfläche des Wirtsorganismus fixiert wird) mit einem Markermolekül versehen sein, das den Nachweis des Produkts auf der Oberfläche erlaubt. So kann der Phenolester beispielsweise mit Biotin gekoppelt sein, in der Art, dass das Biotin am Phenolrest hängt. Die Biotin-gekoppelte auf der Oberfläche des Wirtsorganismus fixierte Phenolkomponente kann dann mit dem Fachmann bekannten Nachweisverfahren für Biotin detektiert werden. Möglich ist auch, an den Phenolrest des Phenolesters einen Fluoreszenzfarbstoff zu koppeln, der dann den direkten Nachweis erlaubt bzw. die Isolierung von Wirtsorganismen, auf deren Oberfläche die fluoreszenzmarkierte Phenylkomponente fixiert ist. Im Fall von Zellen kommt hier die Durchflusscytometrie, z. B. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, in Frage. Werden als Wirtsorganismen Phagen eingesetzt, kann deren Nachweis, bzw. Anreicherung und Isolierung, z. B. durch die Adsorption an mit einem entsprechenden Rezeptormolekül beschichteten Oberflächen erreicht. Als Oberflächen kommen hier beispielsweise Plastikoberflächen (z. B. Mikrotiterplatten) oder magnetische Partikel in Betracht. Eine gängige Methode ist der Nachweis über Biotin oder Digoxigenin, wobei die starke Bindung von Biotin an Streptavidin bzw. von Digoxigenin an einen Digoxigenin-Antikörper ausgenutzt wird.

Wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren als Hilfsenzym eine Peroxidase eingesetzt, so enthält das Medium, in dem die Wirtsorganismen zur Zeit des

Inkontaktbringens mit dem Substrat vorliegen,  $H_2O_2$ , das für die enzymatische Reaktion der Peroxidase notwendig ist. Die Konzentration an  $H_2O_2$  wird dabei so eingestellt, dass sie für die Wirtsorganismen nicht toxisch ist. Geeignete Konzentrationen liegen vorzugsweise im Bereich von 0,00005% (v/v) bis 0,005% (v/v), bevorzugt im Bereich von 0,000075% (v/v) bis 0,004% (v/v), besonders bevorzugt im Bereich von 0,00009% (v/v) bis 0,003% (v/v). Ganz besonders bevorzugt liegt die Konzentration im Bereich von 0,0001% (v/v) bis 0,001% (v/v).

Beschriebene Verfahren zur  $H_2O_2$  vermittelten kovalenten Deposition von phenolischen Komponenten wurde bisher nur zur immunhistochemischen Färbung von fixiertem Zellmaterial, jedoch nicht mit lebenden Zellen oder anderen Organismen eingesetzt, da  $H_2O_2$  ein starkes Zellgift ist und es zu erwarten war, dass die für eine Peroxidase-Reaktion eingesetzte  $H_2O_2$ -Konzentration mit dem Überleben der Zellen nicht vereinbaren ist. Überraschenderweise wurde gefunden, dass die Konzentration an  $H_2O_2$  so weit eingestellt werden kann, dass sie zum einem nicht zum Zelltod führt, zum anderen aber noch eine effiziente Deposition des phenolischen Alkohols auf der Zelloberfläche zulässt. Es wurde gezeigt, dass dieses Verfahren erfolgreich angewendet werden kann, um durch die simultane Zelloberflächenexposition von Enzym (Esterase) und Hilfsenzym (Peroxidase) und den Einsatz von Phenolestern als Substrate, lebende Zellen mit der gewünschten Esteraseaktivität selektiv zu markieren und durch iterative Runden von Isolierung markierter Zellen, Vermehrung der isolierten markierten Zellen und erneute Markierung und Isolierung, Zellen mit der gewünschten Enzymaktivität aus einer Population von Zellen ohne Enzymaktivität zu isolieren.

Bei den in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Wirtsorganismen kann es sich um jede Art von Wirtsorganismen handeln, die für die Präsentation der Kandidatenpolypeptide auf ihrer Oberfläche geeignet sind. Als Wirtsorganismus kommt im Prinzip jeder Organismus in Frage, der in der Lage ist, genetische Information zu tragen, sie zu exprimieren und sich zu replizieren. So umfasst der Begriff „Organismus“ jede Art von Zellen, aber auch Viren und Phagen. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Wirtsorganismen Zellen oder Phagen.

Wenn die Wirtsorganismen Zellen sind, so kann es sich um eukaryontische oder um prokaryontische Zellen handeln. Vorzugsweise sind die Wirtszellen prokaryontische

Organismen, besonders bevorzugt Bakterien. Hierbei bevorzugt sind gram-negative Bakterien und unter diesen sind besonders bevorzugt Wirtszellen der Art *E. coli*.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden Wirtsorganismen eingesetzt, die die Kandidatenpolypeptide derart exprimieren, dass sie von den Wirtsorganismen auf deren Oberfläche präsentiert werden. Dem Fachmann ist eine Vielzahl von Verfahren bekannt, eine Oberflächenexposition eines Proteins auf einem Wirtsorganismus zu erreichen. Derartige Verfahren sind z. B. bekannt unter den Begriffen „Phage display“ und „Microbial display“. Die Exposition auf der Oberfläche beruht zumeist darauf, dass durch Anwendung geeigneter gentechnischer Methoden eine Enzymvariante auf der Oberfläche des Wirtsorganismus in kovalenter Verknüpfung mit einer Komponente der Oberfläche bereitgestellt wird. Bei Verwendung von Bakterien als Wirtsorganismen wird dies z.B. dadurch erreicht, dass das Gen, welches für das Enzym kodiert, das in Hinblick auf seine Eigenschaften optimiert werden soll, operativ mit der kodierenden Sequenz für ein Protein der äußeren Membran eines mikrobiellen Produzenten verknüpft ist, so dass ein Fusionsprotein gebildet wird, welches in der äußeren Membran des Bakteriums verankert ist und die verknüpfte Proteindomäne auf der Außenseite der äußeren Membran exponiert. Als Membranverankerungsdomäne wurde unter anderem ein Fragment des *E. coli* OmpA Proteins (Francisco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 10444-10448), ein *Escherichia coli* Adhäsion (Maurer *et al.*, J. Bacteriol. 179 (1997), 794-804) oder das Intimin aus enteropathogenen *E. coli* (Wentzel *et al.*, J. Bacteriol. 183 (2001), 7273-7284) eingesetzt. Verfahren zur Präsentation von Proteinen auf der Oberfläche von *E. coli* durch die Präsentation als Fusionsproteine mit Porinen der äußeren Membran von *E. coli* wurden insbesondere beschrieben in Lang (Int. J. Med. Microbiol. 290 (2000), 579-585), Francisco *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 2713-2717) und Wentzel *et al.* (J. Biol. Chem. 274 (1999), 21037-21043). Die Präsentation als Fusionsprotein mit einem zellulären Appendix (Fimbrium) wurde z. B. beschrieben in Westerlund-Wikstrom *et al.* (Protein Eng. 10 (1997), 1319-1326), Westerlund-Wikstrom (Int. J. Med. Microbiol. 290 (2000), 223-230), Kjaergaard *et al.* (Appl. Environ. Microbiol. 67 (2001), 5467-5473) und Schembri *et al.* (FEMS Microbiol. Lett. 170 (1999), 363-371). Die Präsentation als Fusionsprotein mit einem Autotransportprotein der äußeren Membran ist z. B. beschrieben in Klauser *et al.* (EMBO J. 11 (1992), 2327-2335) und Maurer (J. Bacteriol. 179 (1997), 794-804).



Beschrieben wurden bereits auch Verfahren zur Präsentation von Polypeptiden auf der Oberfläche anderer Mikroorganismen als *E. coli*. So beschreiben z. B. Jung et al. (Nat. Biotechnol. 16 (1998), 576-580) und Kim et al. (Appl. Environ. Microbiol. 66 (2000), 788-793) die Zelloberflächenpräsentation von Polypeptiden auf der Oberfläche von *Pseudomonas syringae* durch Fusion an das Eisnucleationsprotein. Ebenso wurden bereits Verfahren zur Oberflächenpräsentation von Polypeptiden in *Bacillus subtilis* (Hansson et al., Comb. Chem. High Throughput Screen. 4 (2001), 171-184) und in *Staphylococcus* (Lehtio et al., FEMS Microbiol. Lett. 195 (2001), 197-204) beschrieben. Auch Verfahren zur Oberflächenpräsentation von Polypeptiden auf eukaryontischen Zellen sind bereits bekannt, z. B. für *Saccharomyces cerevisia* (Boder und Wittrup, Nat. Biotechnol. 15 (1997), 553-557; Boder und Wittrup, Methods Enzymol. 328 (2000), 430-444).

Bevorzugte Verfahren zur Expression von Kandidatenpolypeptiden, die zur Präsentation der Polypeptide auf der Oberfläche von Zellen führen, sind dem Fachmann insbesondere bekannt aus der US-Patentanmeldung 20030036092 und aus Olsen et al. (Nature Biotechnology 18 (2000), 1071-1074).

Auch die Präsentation von Polypeptiden auf der Oberfläche von Phagen, das sogenannte Phagedisplay, ist bereits ausführlichen beschrieben und wird vielfach angewandt (siehe z. B. Miyakubo et al. (Nucleic Acids Symp. Ser. 44 (2000), 165-166), Widersten et al. (Meth. Enzymol. 328 (2000), 389-404), Widersten und Mannervik (J. Mol. Biol. 250 (1995), 115-122), Korn et al. (Biol. Chem. 381 (2000), 179-181) und Droge et al. (J. Biotechnol. 101 (2003), 19-28)).

Das erfindungsgemäße Verfahren dient der Identifizierung von Enzymen mit einer gewünschten Substrat-spaltenden Aktivität. Es baut Verfahren auf, die im Stand der Technik bekannt sind, in denen Enzyme mit gewünschten Aktivitäten dadurch identifiziert werden, dass in Wirtsorganismen eine große Anzahl verschiedener Kandidatenpolypeptide exprimiert werden und die Wirtsorganismen ermittelt werden, die die gewünschte Enzymaktivität exprimieren. Die Herstellung von solchen Wirtsorganismen erfolgt in der Regel durch die Bereitstellung von DNA-Bibliotheken, die für eine Vielzahl von Polypeptiden codieren und die Einbringung in entsprechende Wirtsorganismen. Die DNA-Bibliotheken können, z. B. hergestellt werden durch die in-vitro Mutagenese eines Ausgangsgens, welches für ein bestimmtes Enzym codiert. Durch die Mutagenese werden Varianten des Enzyms

erzeugt, die dann nach Expression in den Wirtsorganismen auf ihre enzymatischen Eigenschaften hin getestet bzw. selektioniert werden können. Geeignete Methoden zur in-vitro Mutagenese und zur Herstellung geeigneter Wirtsorganismen sind dem Fachmann bekannt und sind z. B. ausführlich beschrieben in der US-Patentanmeldung US 20030036092. Sie umfassen z. B. die chemische Mutagenese, insbesondere von isolierter DNA, Genamplifikation durch „Error prone“ PCR und Oligonukleotid-Mutagenese. Weitere Möglichkeiten sind die Ligation von randomisierten Genabschnitten (Kassettenmutagenese), Gene Shuffling, in vivo Mutagenese mit mutagenen Agenzien und die Verwendung von E. coli-Mutatorstämmen. Erfindungsgemäß wird somit in den Wirtsorganismen eine Bibliothek exprimiert, wobei diese Bibliothek eine Vielzahl von Kandidatenpolypeptiden kodiert.

Die Identifizierung der Wirtsorganismen in Schritt (b) des Verfahrens kann nach dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen wie sie z. B. beschrieben sind in der US-Patentanmeldung 20030036092. Falls das durch die Substratspaltungsreaktion hergestellte Produkt von sich aus ein Produkt ist, dass einem direkten oder indirekten Nachweis zugänglich ist, so ist die Verwendung eines Markermoleküls nicht unbedingt notwendig. Wie oben erläutert, wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren jedoch vorzugsweise ein Substrat verwendet, das mit einem Markermolekül gekoppelt ist, das einen Nachweis des auf der Oberfläche des Wirtsorganismus gebundenen Produkts erlaubt. Beispiele für solche Marker sind oben genannt und umfassen Biotin oder Fluoreszenzfarbstoffe.

Neben der Identifizierung der Produkt-tragenden Wirtsorganismen können derartige Marker auch die Isolierung dieser Organismen erlauben. Bevorzugt wird die Isolierung ausgeführt wie in der US-Patentanmeldung 20030036092 beschrieben. Im Fall von Fluoreszenzfarbstoffen, die direkt an das Produkt gekoppelt sind, können Zellen, die ein derart markiertes Produkt auf ihrer Oberfläche tragen durch Durchflusscytometrie, z. B. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, isoliert werden. Dasselbe Verfahren kann angewendet werden, wenn der an das Produkt gekoppelte Marker mit einem anderen Stoff konjugiert wird, der selber fluoresziert oder mit einem Fluoreszenzmarker gekoppelt ist. Ein Beispiel hierfür ist die Möglichkeit, Biotin als Marker an dem Produkt zu haben und das Biotin nachzuweisen durch Streptavidin, an das ein Fluoreszenzmarker gekoppelt ist. Im Fall der Verwendung von Phagen kommt z. B. eine Isolierung über Oberflächen in Frage, die einen

Rezeptor für das verwendete Markermolekül tragen, wie bereits oben beschrieben wurde.

Eine andere Möglichkeit zur Isolierung der Wirtsorganismen, die (markiertes) Produkt an ihrer Oberfläche gebunden haben, ist die magnetische (Zell-)Sortierung. Hierfür werden die Wirtsorganismen mit magnetischen Partikeln in Berührung gebracht, die auf ihrer Oberfläche ein Molekül tragen, das das auf der Oberfläche des Wirtsorganismus fixierte Produkt bzw. den an dieses gekoppelten Marker bindet. So können z. B. solche magnetische Partikel auf ihrer Oberfläche ein Biotin-bindendes Molekül tragen (z. B. Streptavidin) und würden dann Organismen binden, die auf ihrer Oberfläche ein mit Biotin gekoppeltes Produkt tragen.

Es besteht die Möglichkeit, nach einer ersten (Zell-)Sortierung die isolierten Zellen/Organismen zu vermehren, erneut mit Substrat in Berührung zu bringen und erneut einer (Zell-)Sortierung zu unterziehen. Diese Vorgänge können mehrmals wiederholt werden, um eine Anreicherung der gewünschten Zellen/Organismen zu erhalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren führt im Schritt (b) zur Identifizierung von Wirtsorganismen, bei denen das Produkt der Substrat-spaltenden Aktivität auf der Oberfläche fixiert ist und die daher voraussichtlich die gewünschte Enzymaktivität exprimieren. Ausgehend von derart identifizierten Organismen kann das erfindungsgemäße Verfahren wiederholt angewendet werden.

Dazu wird die in den identifizierten Wirtsorganismen enthaltene DNA-Sequenz, die die Enzymaktivität kodiert, als Ausgangspunkt für die Erzeugung einer neuen Bibliothek verwendet, die eine Vielzahl von Kandidatenpolypeptiden kodiert. Dies kann durch dem Fachmann bekannte Mutageneseverfahren erfolgen, wie sie schon oben genannt wurden. Wirtsorganismen, die diese Bibliothek exprimieren werden dann wiederum in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Wirtsorganismen, die ein Kandidatenpolypeptid (Enzym) derart exprimieren, dass es auf der Oberfläche des Wirtsorganismus präsentiert wird, und die gleichzeitig auf ihrer Oberfläche ein Hilfsenzym tragen, welches in der Lage ist, eine Reaktion zu katalysieren, die die Ausbildung einer kovalenten Bindung ermöglicht zwischen der Oberfläche des Wirtsorganismus und einem Produkt einer Substratspaltungsreaktion, die von dem Kandidatenpolypeptid katalysiert wird. Für die bevorzugten Ausführungsformen der Wirtsorganismen, Kandidatenpolypeptide (Enzyme), Hilfsenzyme etc. gilt dasselbe,

was oben bereits in Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gesagt wurde.

Der Offenbarungsgehalt der im Zusammenhang mit der Beschreibung der Erfindung genannten Dokumente wird hiermit durch Bezugnahme in die vorliegende Anmeldung inkorporiert.

Die folgenden Beispiele dienen der Erläuterung und Illustrierung der Erfindung. Die Erfindung ist jedoch nicht auf die in den Beispielen gezeigten Ausführungsformen beschränkt, sondern betrifft alle oben erläuterten möglichen Ausführungsformen.

**Figur 1: Schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens am Beispiel der Isolierung von Zellen mit Esteraseaktivität durch kovalente Deposition des Hydrolyseprodukts auf der Zelloberfläche.** Im Uhrzeigersinn: Verwendung einer Bibliothek von *E. coli* Zellen, welche zufallsmäßig variierte Esterasegene tragen. Nach Induktion der Genexpression wird die Esterase auf der Zelloberfläche präsentiert. Es wird dann das Hilfsenzym Peroxidase auf der Oberfläche der Bakterien fixiert. Nicht gebundenes Enzym wird durch Zentrifugation der Bakterien und Verwerfen des Überstandes entfernt. Dann wird ein Ester-Substrat zugegeben, welches ein phenolischer Ester ist, bei dem die Alkoholfunktion mit einem detektierbaren Signalmolekül (hier Biotin) verknüpft ist. Das durch Hydrolyse des Esters freigesetzte Biotintyramid (in Figur 1 mit einem Dreieck schematisch bezeichnet) wird durch die Zelloberflächen-fixierte Peroxidase in Gegenwart von  $H_2O_2$  aktiviert. Das Phenolradikal reagiert mit aromatischen Resten auf der Zelloberfläche und wird dadurch kovalent fixiert. Nicht abreagierte Substratmoleküle werden durch Zentrifugation und Waschen der Zellen entfernt. Das oberflächenfixierte Signalmolekül kann direkt nachgewiesen werden, wenn es ein Fluoreszenzfarbstoff ist oder indirekt nachgewiesen werden, wie hier am Beispiel der Deposition von Biotin und dessen Nachweis durch Streptavidin, R-Phycoerythrin Konjugat gezeigt. Damit erfolgt eine Kopplung der Esteraseaktivität der Zelle mit einem detektierbaren Zelloberflächensignal, welches die Isolierung einer Esterase-aktiven Zelle aus einer Population von Zellen, z.B. durch Anwendung von Durchflußzytometrie oder magnetischer Zellsortierung ermöglicht.

**Figur 2: TSA-Reaktion (Tyramid Signal Amplifikation).** Peroxidase-vermittelte kovalente Kopplung von Biotin-Tyramid mit einem Tyrosylrest eines Proteins. Ein

Biotinmolekül, welches mit einem Phenol-Derivat verknüpft ist, wird durch Peroxidase in Gegenwart von  $H_2O_2$  durch Bildung eines Phenylradikals aktiviert. Dieses Radikal reagiert, da es sehr kurzlebig ist, in der Nähe seines Entstehungsortes mit aromatischen Resten ab. Damit wird eine kovalente Fixierung des dektierbaren Signals – hier Biotin – erreicht.

**Figur 3: Struktur von LC-LC-Biotin-Tyramid Octansäureester.** Dieser Ester kann als Substratmolekül für eine Esterase eingesetzt werden. Das freigesetzte Biotin-tyramid kann dann durch Peroxidase in Gegenwart von  $H_2O_2$  aktiviert werden.

**Figur 4: Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des Esterase Gens *estA* aus *Pseudomonas aeruginosa*** (aus Wilhelm et al., *J. Bacteriol.* 181 (1999), 6977-6986) . Die kodierende Aminosäuresequenz beginnt bei Base 206. Die putative Signalsequenz ist durch einen Pfeil hervorgehoben.

**Figur 5: Zelloberflächenpräsentation von EstA.** Zum Nachweis der Zelloberflächen-exposition von EstA wurden induzierte *E. coli* Zellen, die das *estA* Gen unter *lac*-Promotorkontrolle exprimieren, mit anti-EstA Antikörper inkubiert und mit einem biotinylierten zweiten Antikörper und Streptavidin, Phycoerythrin-Konjugat angefärbt. Die Immunfluoreszenz der Zellen wurde in einem Zeiss Axioskop (Filter 15) analysiert. Links: Fluoreszenz; rechts: Durchlichtaufnahme.

**Figur 6: Esterase-vermittelte Deposition von Biotin auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen.** Induzierte *E. coli* Zellen, die auf ihrer Oberfläche sowohl Peroxidase, als auch EstA tragen (*E. coli* pBBX+) und gleich behandelte Kontrollzellen, die kein *estA*-Gen enthalten (pBBR1MCS), wurden mit dem Substrat Octansäure-Biotin-LC-LC-Tyramidester (Figur 3) in Gegenwart von 0,001 %  $H_2O_2$  inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen des gleichen *E. coli* Stammes, die kein *estA*-Gen tragen. Die Zellen wurden nach 15-minütiger Inkubation in PBS-Puffer gewaschen und mit Streptavidin, Phycoerythrin-Konjugat angefärbt. Die Immunfluoreszenz der Zellen wurde in einem Zeiss Axioskop (Filter 15) analysiert. Links: Fluoreszenzmikroskopie; rechts: Durchlichtmikroskopie.

**Figur 7: Isolierung von *E. coli* Zellen mit Esterase-Aktivität aus einer Mischung mit EstA-negativen Zellen**

Zur Überprüfung der Anreicherung durch magnetische Sortierung von Zellen, welche EstA-Aktivität zeigen, wurden induzierte Zellen jeder Selektionsrunde auf ihre

Esteraseaktivität hin überprüft. Als hydrolysierbares Standardsubstrat diente p-Nitrophenylcaprylat. Während das Ausgangsgemisch keine Esteraseaktivität zeigt, ist nach der ersten Selektionsrunde bereits eine leicht erhöhte Substrathydrolyse zu erkennen. Diese ist nach der zweiten Selektionsrunde bereits fast auf dem Niveau einer entsprechenden Probe induzierter pBBX+ Transformanten von *E. coli* JM109.

### **Beispiel 1:**

#### **Herstellung von *E. coli* Zellen, die Esterase auf ihrer Zelloberfläche präsentieren**

Als Beispiel wurde die Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa* eingesetzt (Wilhelm et al., *J. Bacteriol.* 181 (1999), 6977-6986). EstA ist eine Esterase aus *Pseudomonas aeruginosa*, welche aus einer aminoterminalen Zelloberflächen-exponierten Enzymdomäne und einer Membranankerdomäne besteht, welche in der äußeren Membran lokalisiert ist und eine Translokation der aminoterminalen Domäne durch die äußere Membran vermittelt. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von EstA ist in Figur 4 gezeigt.

Die codierende Sequenz von EstA (Figur 4) wurde in den Vektor PBBX+ (Wilhelm et al., loc. cit.) eingeführt und dadurch unter Kontrolle des *lac* Promotors gebracht. Nach Transformation des *E. coli* Stammes JM109 (Stratagene) wurden *E. coli* Zellen erhalten, die in der Lage waren, das Esterasesubstrat Octansäure-p-Nitrophenylester zu hydrolysieren (Wilhelm et al., loc. cit.). Die Zelloberflächenpräsentation von EstA wurde durch Immunfluoreszenzfärbung der Zellen durch successive Inkubation mit anti-EstA Antikörper (aus Kaninchen), einem biotinylierten anti-Kaninchen-Antikörper und Streptavidin, Phycoerythrin Konjugat nachgewiesen. So behandelte Zellen zeigten bei Analyse im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop, Filter 15) eine rote Fluoreszenz (Figur 5).

### **Beispiel 2:**

#### **Kopplung von Horseradish Peroxidase (HRP) auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen**

10 µl Natriumperiodatlösung (0,088 M) wurden zu 100 µl Horseradish Peroxidase (10 mg/ml) gegeben. Der Ansatz wurde 1h bei Raumtemperatur im Dunkeln geschüttelt. Dann wurde das Enzym durch Gelfiltration über eine Sephadex G25 Säule vom

Überschuß an Natriumperiodat abgetrennt, in 2ml PBS Puffer verdünnt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **Beispiel 3:**

##### **Synthese des EstA-Substrates LC-LC-Biotin-Tyramid Octansäureester**

Das EstA Substrat (Figur 3) wurde aus LC-LC-Biotin-Tyramid durch Umsetzung von 0,2 mg (1,17  $\mu\text{mol}$ ) Octanoylchlorid mit 0,34 mg (0,57  $\mu\text{mol}$ ) LC-LC-Biotin-Tyramid (Pierce) in 0,2 ml Pyridin hergestellt. Nach 60-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz lyophilisiert und in 0,1 ml Dimethylformamid aufgenommen.

#### **Beispiel 4:**

##### **Esterase-vermittelte Deposition von Biotin auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen**

*E. coli* JM109 Zellen, welche das Plasmid pBBX+ trugen, wurde bei einer optischen Dichte von 0,4 mit IPTG (Endkonzentration 1mM) zur Induktion der Expression des *estA* Gens versetzt und 60 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Als Kontrolle wurden *E. coli* JM109 Zellen verwendet, die kein *estA*-Gen enthalten. 500  $\mu\text{l}$  der Kulturen beider Zelltypen wurden abzentrifugiert, mit oxidiertem Peroxidase gekoppelt, anschließend dreimal mit je 500  $\mu\text{l}$  PBS gewaschen und in 500  $\mu\text{l}$  100 mM Kaliumphosphatpuffer, welcher 0,0029  $\mu\text{mol}$  Biotin-LC-LC-Tyramid-Octansäureester sowie 0,001 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  enthielt für 15 min inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 10  $\mu\text{l}$  PBS, welches 1  $\mu\text{l}$  Streptavidin, R-Phycoerythrin Konjugat (Molecular Probes) enthielt resuspendiert. Nach 5 minütiger Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 500  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer gewaschen. Dann wurde ein Aliquot im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop, Filter 15) analysiert. Eine Deposition von Biotin-Tyramid war nur bei den Zellen mit EstA-Aktivität nachzuweisen (Figur 6).

#### **Beispiel 5:**

##### **Isolierung von Zellen mit Esterase-Aktivität aus einer $1:10^6$ Mischung mit Esterase-negativen Zellen**

Um zu überprüfen, ob es möglich ist Zellen mit Esterase-Aktivität aus einer Sammlung von Zellen ohne Esterase-Aktivität zu isolieren, wurden mit IPTG induzierte *E. coli* JM109 Zellen, die das Plasmid pBBR1MCS enthalten, welches kein *estA*-Gen umfasst, und JM109 Zellen, welche das Plasmid pBBX+ enthalten,

welches ein estA-Gen enthält, im Verhältnis  $10^6:1$  gemischt. Das  $1:10^6$ -Gemisch wurde anschließend wie oben beschrieben mit dem Biotin-LC-LC-Tyramid-Octansäureester markiert. Eingesetzt wurden erneut  $0,0029 \mu\text{mol}$  Substrat in  $500 \mu\text{l}$  Kaliumphosphatpuffer. Die Inkubationszeit betrug wiederum 15 min. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert und dreimal mit  $500 \mu\text{l}$  PBS-Puffer gewaschen. Dann wurde zu  $200 \mu\text{l}$  der Zellsuspension  $20 \mu\text{l}$  Streptavidin-beschichtete paramagnetischen Beads (Mitenyi Biotech, Bergisch Gladbach) gegeben. Nach 15 minütiger Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und dreimal mit je  $500 \mu\text{l}$  PBS gewaschen. Die Zellen wurden in  $500 \mu\text{l}$  PBS resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend durch eine mit Eisenkugeln gefüllte und in ein starkes Magnetfeld eingebrachte Säule (MidiMacs, Mitenyi Biotech Bergisch Gladbach) passagiert. Die Säule wurde dreimal mit je 2 ml PBS-Puffer gewaschen. In der Säule zurückgehaltene Zellen wurde nach Entfernen aus dem Magnetfeld mit 2 ml PBS-Puffer eluiert. Die Zellen wurden auf Selektivplatten plattiert und über Nacht vermehrt. Am nächsten Tag wurden die Zellen abgeschwämmt und der Prozess wiederholt.

Nach einer jeden Selektionsrunde wurden die sortierten Zellen mit je 2 ml dYT von den Platten abgeerntet und neu angezogen. Dazu wurden jeweils  $50 \mu\text{l}$  geerntete Zellen in 50 ml dYT-Cm<sup>25</sup> inokuliert. Nach Induktion der Kultur erfolgte die nächste Markierungs- und Sortierungsrunde. Auf diese Weise wurden drei Selektionsrunden durchgeführt

Zur Überprüfung der Anreicherungen wurden induzierte Zellen jeder Selektionsrunde auf ihre Esteraseaktivität hin überprüft. Als hydrolysierbares Standardsubstrat diente p-Nitrophenylcaprylat. Während das Ausgangsgemisch keine Esteraseaktivität zeigt, ist nach der ersten Selektionsrunde bereits eine leicht erhöhte Substrathydrolyse zu erkennen. Diese ist nach der zweiten Selektionsrunden bereits fast auf dem Niveau einer entsprechenden Probe induzierter pBBX+ Transformanten von E. coli JM109.



## Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung eines Enzyms mit einer gewünschten Substratspaltenden Aktivität, wobei eine Bibliothek, die eine Vielzahl verschiedener Kandidatenpolypeptide kodiert, derart von geeigneten Wirtsorganismen exprimiert wird, dass die Kandidatenpolypeptide auf der Oberfläche der Wirtsorganismen präsentiert werden und die Wirtsorganismen mit dem zu spaltenden Substrat in Kontakt gebracht werden, dadurch gekennzeichnet, dass
  - (a) auf der Oberfläche der Wirtsorganismen ein Hilfsenzym bereitgestellt wird, welches die Ausbildung einer kovalenten Bindung ermöglicht zwischen der Oberfläche der Wirtsorganismen und einem Produkt, das durch die Substratspaltungs-Reaktion entsteht, die durch ein Kandidatenpolypeptid katalysiert wird, und
  - (b) die Wirtsorganismen identifiziert werden, bei denen das Produkt auf der Oberfläche gebunden ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Enzym Hydrolaseaktivität aufweist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Enzym eine Esterase ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Esterase die Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa* ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Hilfsenzym eine Peroxidase ist.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Peroxidase eine Meerrettich Peroxidase ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Substrat ein Ester ist.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der Ester ein Phenolester ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Substrat mit einem der Marker verbunden ist, der den Nachweis des auf der Zelloberfläche kovalent gebundenen Produktes erlaubt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei der Marker ein Fluoreszenzmarker, Chemilumineszenzmarker, radioaktiver Marker, Biotin, Avidin, magnetische Partikel oder ein Enzym ist, das zu einem nachweisbaren Farbstoff führt bei Kontakt mit einer chromogenen Substanz.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei der Wirtsorganismus ein Phage ist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei der Wirtsorganismus eine Zelle ist.
13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei der Wirtsorganismus ein prokaryontischer Organismus ist.
14. Verfahren Ansprüche 13, wobei der prokaryontische Organismus ein gram-negatives Bakterium ist.
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei das gram-negativen Bakterium von der Art *E. coli* ist.
16. Wirtsorganismus, der ein Kandidatenpolypeptid (Enzym) derart exprimiert, dass es auf der Oberfläche des Wirtsorganismus präsentiert wird, und der gleichzeitig auf seiner Oberfläche ein Hilfsenzym trägt, welches in der Lage ist, eine Reaktion zu katalysieren, die die Ausbildung einer kovalenten Bindung ermöglicht zwischen der Oberfläche des Wirtsorganismus und einem Produkt einer Substratspaltungsreaktion, die von dem Kandidatenpolypeptid katalysiert wird.

1/7

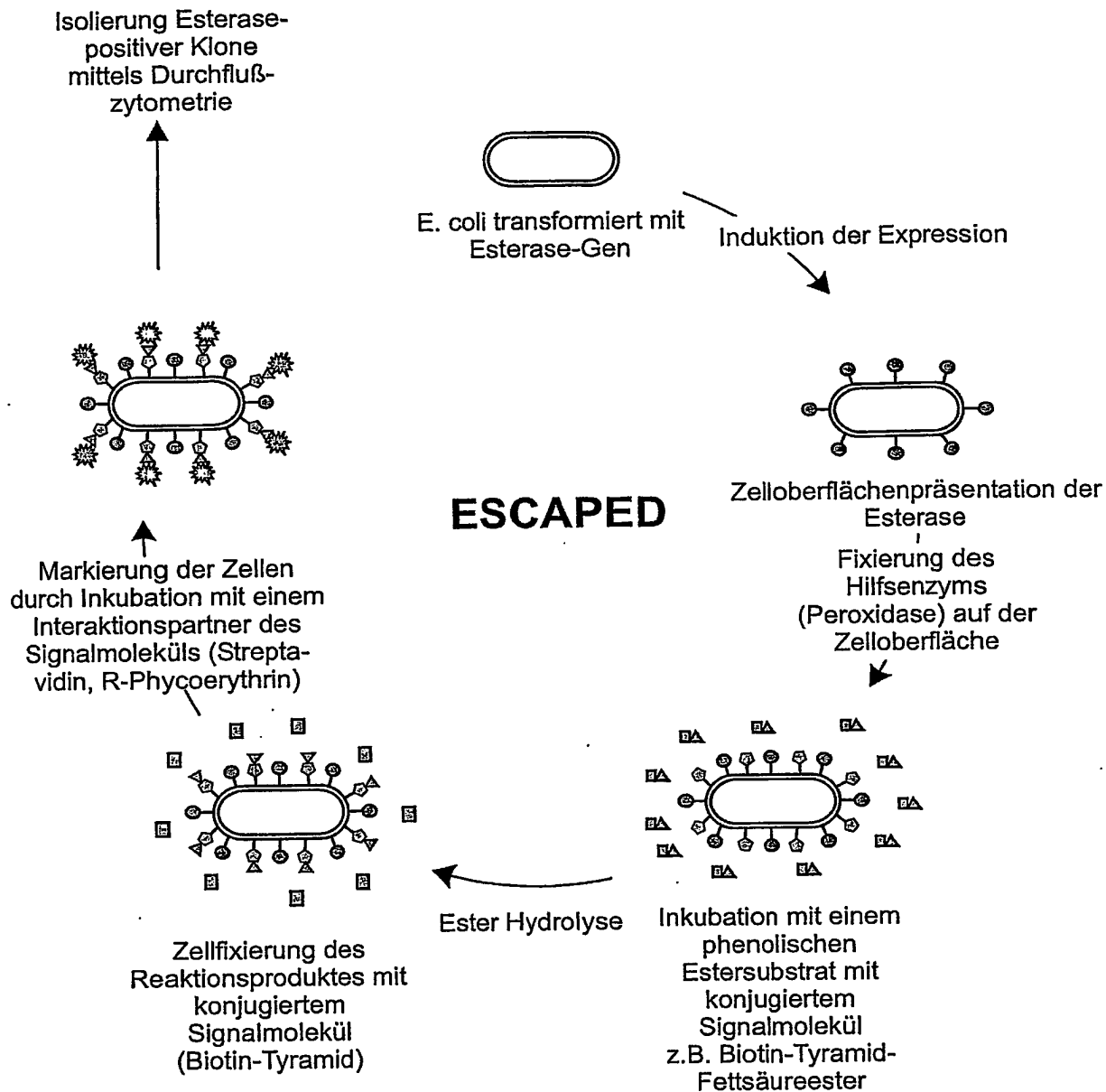


Fig 1

2/7

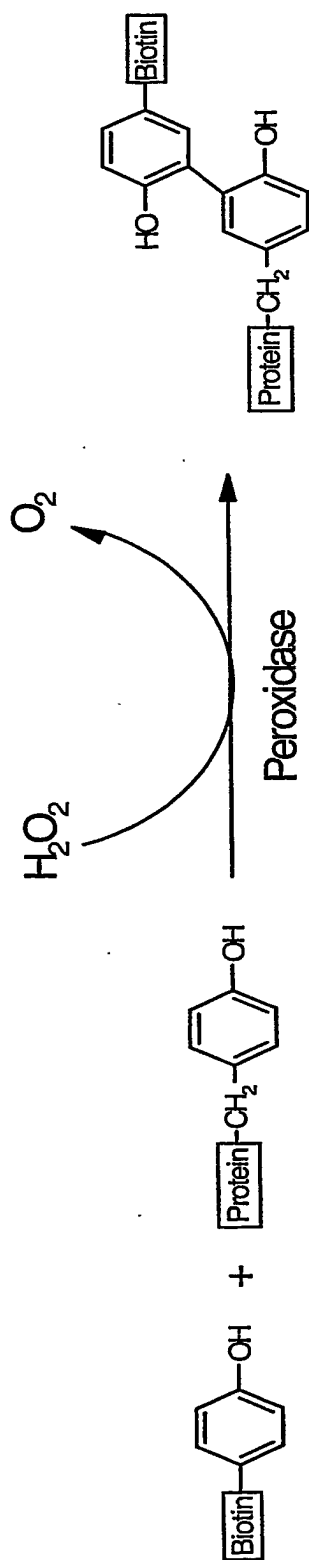


Fig. 2

3/7

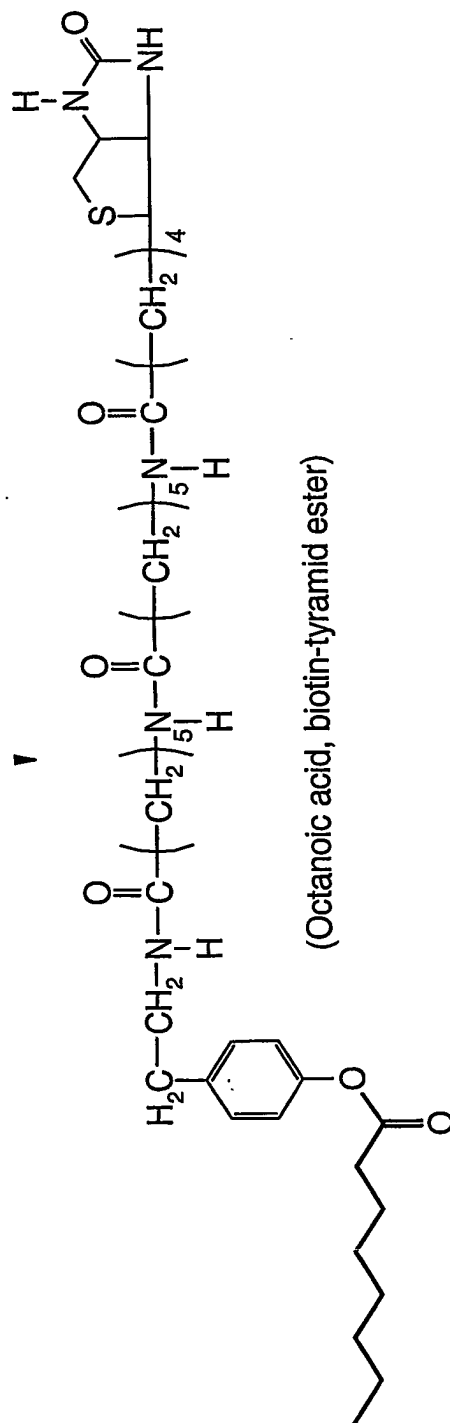


Fig. 3

*P. aeruginosa* EstA:

GAAGAAGATCGGCCTGTGGGCGGTACTTCTGCTGGGGGTCGCTCTGCTGGTAATAATGGCAATGAGCCT  
 GCTGCGTTTCTCGCCGAACAAGCCATGAGCCGGTTCGCGCTATGCTGTTCCGGCTGAGGAGGCTTTACG  
 ACGGGCCCCGGGGCGCATGCCGACGACGCGGCGGCCGACAATAAAAACAAATCATGGAGTAAGAGAAAT  
 GATCAGAATGGCGCTCAAGCCACTGGTAGCGGCTGCTGCTGGCTTCGCTGTCCACCGCCCCGAGGC  
 TGCTCCTTCGCCCTATTTCGACGCTGGTGGTGTTCGGCGACAGCCTCAGCGATGCCGGGCAGTTCCC  
 CGATCCTGCCGGCCCCGCGGAAGCACCTCGCGTTTTACCAACCGGGTCCGGCCGACCTA  
 CCAGAACGGCAGCGGCGAGATCTTCGACCGACCGCGCCCATGCTGCTCGGCAATCAGCT  
 CGGCATCGCCCCGGGTGACCTGGCTGCCTCGACCTCGCCGGTCAACGCCAGCAGGGCAT  
 CGCCGACGGCAACAACCTGGGCGGTGGGCGGCTACCGGACCGATCAGATCTACGACTCGAT  
 CACCGCGCCAACGGCTCGCTGATCGAGCGGACAATACCTCCTGCGCAGCCGCGATGG  
 CTACCTGGTGGACCGTGCCCGCCAGGGCTGGGTGCCGACCCGAACGCGTTGTACTACAT  
 CACCGGCGGCGGCAACGACTTTCTCCAGGGGGCGCATCCTCAACGACGTCCAGGCCCAACA  
 GGCCGCGGTGCGCTGGTGGATAGCGTGCAGGCCCTGCAGCAGGCCGCGCGCGCTGAG  
 CGTGGTCTGGCTGTTGCCCCGACCTGGGCGTACCCCGGCTACCTTCGGTGGTCCCTTGAG  
 CCTTCGCCAGCCAACCTCAGCGGCACGTTCAACGCCGAGCTGACCGCCAGTTGAGCCAG  
 GCCGGCGCAACGTCATTCCGTTGAACATCCCGCTGCTGCTCAAGGAAGGCATGGCCAAC  
 CCGGCTTCCTTCGGCCTGGCCGCGACAGAACCTGATCGGCACCTGTTTCAGCGGCAACG  
 GCTGCACCATGAACCCGACCTACGGGATCAACGGCAGCACGCCCGACCCGAGCAAAATGC  
 TGTTCAACGACAGCGTGCACCCGACCATCACCGGCCAGCGCCTGATCGCCGACTACACT  
 ATTGCTGCTGTGCGCGCCCTGGGAGCTGACCCTGCTGCCGGAATGGCCACGGCACCT  
 GCGTGCCTACCAGGACGAACCTGCGCAGCCAGTGGCAGGCGGACTGGGAGAACTGGCAGA  
 ACGTCGGCCAGTGGCGCGGCTTCGTCGGCGGCGGTGGCCAGCGCCTGGACTTCGACTCCC  
 AGGACAGCGCCGCGCAGCGGCGACGGCAACGGCTACAACCTGACCCTTGGTGGCAGCTACC  
 GCATCGACGAGGCCTGGCGCGCCGGGGTTCGCCCGCGGTTTCTACCGCAGAAGCTGGAAG  
 CCGGCGCCAAGGATTCCGACTACCGGATGAACAGCTACATGGCCAGCGCCTTCGTGCACT  
 ACCAGGAAAACCGCTGGTGGGCCGACGCGGCGTTGACCGGCGGCTACCTCGACTACGACG  
 ACCTGAAGCGCAAGTTCGCCCTGGGCGGCGGCGAGCGCAGCGAGAAAGGCGACACCAAC  
 GGCCACCTGTGGGCGTTTCAGCGCGCGCCTGGGCTACGACATCGCCAGCAGGCCGACAGT  
 CCCTGGCACCTGTGCGCGTTTCGTGACGCGCGACTATGCACGGGTGAGGTGACGGCTATT  
 CCGAGAAGGGCGCCAGCGCCACCGCGCTGACTACGACGACCAGAAGCGCAGCTCGAAG  
 CGCTGGGCGCCGGCCTGCAAGGCAAGTACGCGTTTCGGCAGCGATACCCAGCTGTTCCGCC  
 GAGTACGCCACGAACGTGAGTACGAGGACGACACCCAGGACCTGACCATGTCCCTCAAC  
 AGCCTGCCGGGCAATCGCTTCACCTCGAAGGCTACACCCCGCAGGACCATCTCAACCGC  
 GTCTCACTCGGCTTCAGCCAGAAGCTGGGCGCGGAGCTGTCGCTGCGCGGCGGCTACAAC  
 TGGCGCAAGGGCGAGGACGATACCCAGCAGAGCGTCAGCCTGGCGCTGAGCCTGGACTTC  
 TGAACCGGCGGCGGCGCCCGGTGCGCGCC

- AS-Sequenz:

MIRMALKPLVAACLLASLSTAPQAAPSPYSTLVVFGDSLSDAGQFPDPAGPAGSTSRFTNVRG  
 PTYQNGSGEIFGPTAPMLLGNQLGIAPGDLAASTSPVNAQQGIADGNNWAVGGYRTDQIYDSI  
 TAANGSLIERDNTLLRSRDGYLVDRARQGLGADPNALYYITGGGNDFLQGRILNDVQAQAA  
 GRLVDSVQALQQAGARYIVVWLLPDLGLTPATFGGPLQPFASQLSGTFNAELTAQLSQAGAN  
 VIPLNIPLLLKEGMANPASFGLAADQNLIGTCFSGNGCTMNPTYGINGSTPDPSKLLFNDVSHPT  
 ITGQRLIADYTYSLLSAPWELTLLPEMAHGTLRAYQDELRSQWQADWENWQNVGQWRGFVG  
 GGGQRLDFDSQDSAASGDGNGYNLTGGSYRIDEAWRAGVAAGFYRQKLEAGAKDSYRM  
 NSYMASAFVQYQENRWWDAAALTGGYLDYDDLKRKFALGGGERSEKGD TNHGLWAFSARL  
 GYDIAQQADSPWHLSPFVSADYARVEVDGYSEKGASATALDYDDQKRSSKRLGAGLQGYA  
 FGSDTQLFAEYAHREYEDDTQDLTMSLNSLPGNRFTLEGYTPQDHLNRVSLGFSQKLAPELS  
 LRGGYNWRKGEDDTQQSVSLALSLDF

Fig. 4

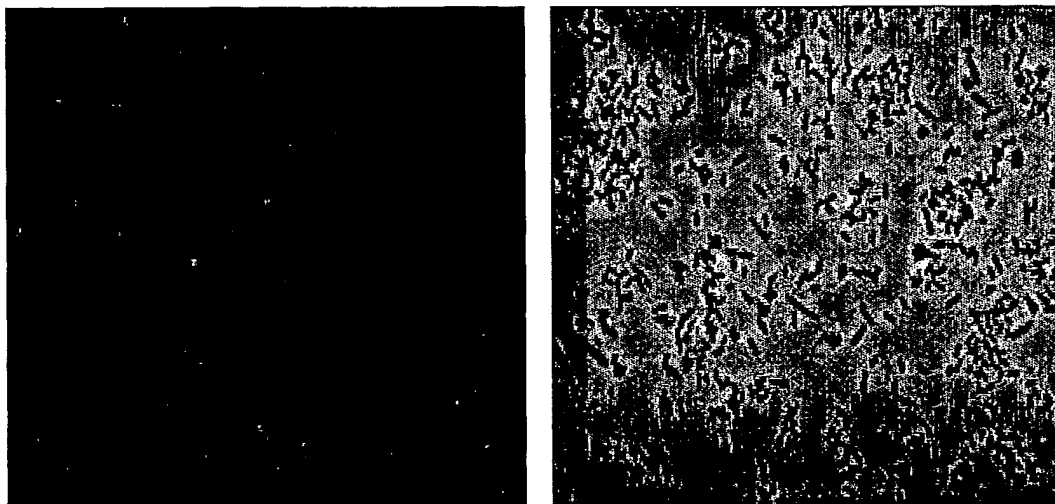


Fig. 5

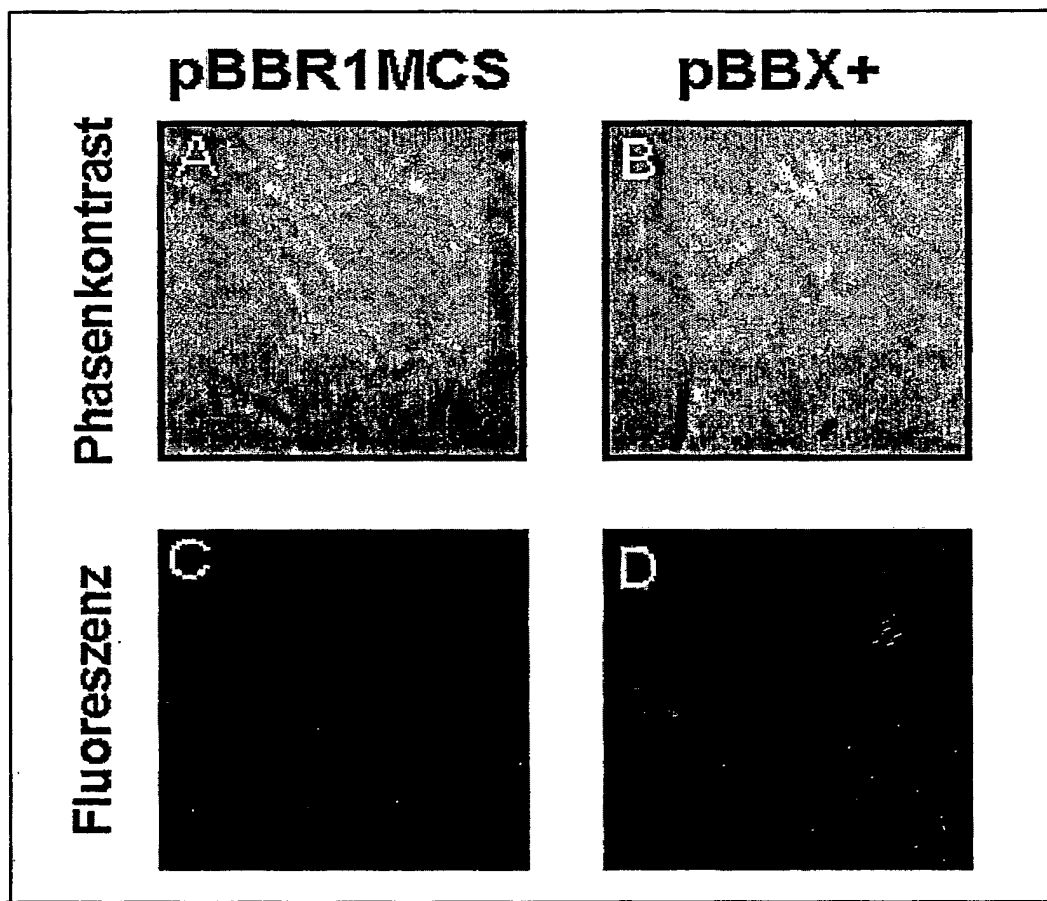


Fig. 6



7/7

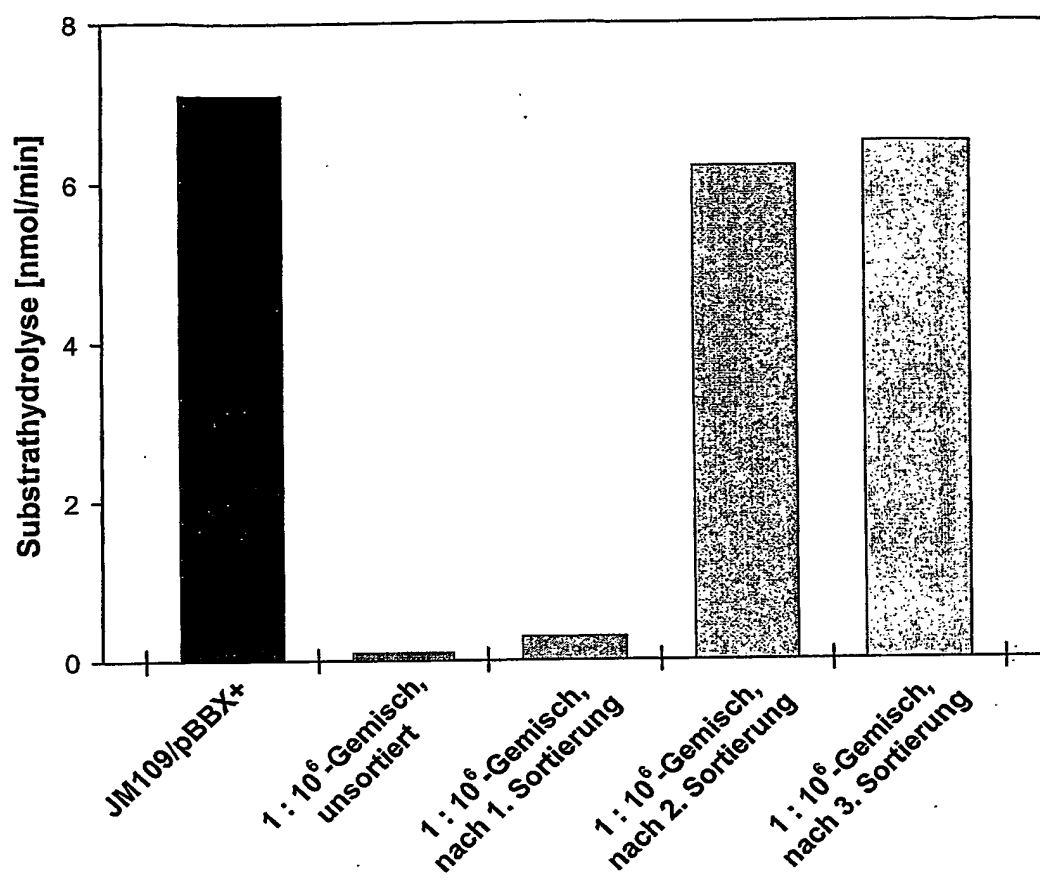


Fig. 7

BEST AVAILABLE COPY

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Selecore GmbH

<120> Verfahren zur Identifizierung von Enzymen mit gewünschten  
Eigenschaften durch Verankerung der Reaktionsprodukte auf der Oberfläche  
Enzym-präsentierender Organismen

&lt;130&gt; H2768 PCT S3

&lt;150&gt; EP 03023953.7

&lt;151&gt; 2003-10-22

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2173

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Pseudomonas aeruginosa

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (206)..(2143)

&lt;223&gt;

```

<400> 1
gaagaagatc ggcctgtggg cggtacttct gctgggggtc gctctgctgg taataatggc      60
aatgagcctg ctgcgttcct cgccgaacaa gccatgagcc ggttccgcgc tatgctgttc      120
ggctgaggag gctttacgac gggccccggg ggcgatgccg acgacgcggc ggccccgacaa      180
taaaaacaaa tcattgagta agaga atg atc aga atg gcg ctc aag cca ctg      232
                               Met Ile Arg Met Ala Leu Lys Pro Leu
                               1                               5

gta gcg gcc tgc ctg ctg gct tcg ctg tcc acc gcc ccg cag gct gct      280
Val Ala Ala Cys Leu Leu Ala Ser Leu Ser Thr Ala Pro Gln Ala Ala
10                               15                               20                               25

cct tcg ccc tat tcg acg ctg gtg gtg ttc ggc gac agc ctc agc gat      328
Pro Ser Pro Tyr Ser Thr Leu Val Val Phe Gly Asp Ser Leu Ser Asp
                               30                               35                               40

gcc ggg cag ttc ccc gat cct gcc ggc ccc gcc gga agc acc tcg cgt      376
Ala Gly Gln Phe Pro Asp Pro Ala Gly Pro Ala Gly Ser Thr Ser Arg
                               45                               50                               55

ttc acc aac cgg gtc ggc ccg acc tac cag aac ggc agc ggc gag atc      424
Phe Thr Asn Arg Val Gly Pro Thr Tyr Gln Asn Gly Ser Gly Glu Ile
                               60                               65                               70

ttc gga ccg acc gcg ccc atg ctg ctc ggc aat cag ctc ggc atc gcc      472
Phe Gly Pro Thr Ala Pro Met Leu Leu Gly Asn Gln Leu Gly Ile Ala
75                               80                               85

ccg ggt gac ctg gct gcc tcg acc tcg ccg gtc aac gcc cag cag ggc      520

```

2/7

Pro Gly Asp Leu Ala Ala Ser Thr Ser Pro Val Asn Ala Gln Gln Gly	
90 95 100 105	
atc gcc gac ggc aac aac tgg gcg gtg ggc ggc tac cgg acc gat cag	568
Ile Ala Asp Gly Ser Asn Trp Ala Val Gly Gly Tyr Arg Thr Asp Gln	
110 115 120	
atc tac gac tgc atc acc gcg gcc aac ggc tgc ctg atc gag cgc gac	616
Ile Tyr Asp Ser Ile Thr Ala Ala Asn Gly Ser Leu Ile Glu Arg Asp	
125 130 135	
aat acc ctc ctg cgc agc cgc gat ggc tac ctg gtg gac cgt gcc cgc	664
Asn Thr Leu Leu Arg Ser Arg Asp Gly Tyr Leu Val Asp Arg Ala Arg	
140 145 150	
cag ggc ctg ggt gcc gac ccg aac gcg ttg tac tac atc acc ggc ggc	712
Gln Gly Leu Gly Ala Asp Pro Asn Ala Leu Tyr Tyr Ile Thr Gly Gly	
155 160 165	
ggc aac gac ttt ctc cag ggg cgc atc ctc aac gac gtc cag gcc caa	760
Gly Asn Asp Phe Leu Gln Gly Arg Ile Leu Asn Asp Val Gln Ala Gln	
170 175 180 185	
cag gcc gcc ggt cgc ctg gtg gat agc gtg cag gcc ctg cag cag gcc	808
Gln Ala Ala Gly Arg Leu Val Asp Ser Val Gln Ala Leu Gln Gln Ala	
190 195 200	
ggc gcg cgc tac atc gtg gtc tgg ctg ttg ccc gac ctg ggc ctg acc	856
Gly Ala Arg Tyr Ile Val Val Trp Leu Leu Pro Asp Leu Gly Leu Thr	
205 210 215	
ccg gct acc ttc ggt ggt ccc ttg cag cct ttc gcc agc caa ctc agc	904
Pro Ala Thr Phe Gly Gly Pro Leu Gln Pro Phe Ala Ser Gln Leu Ser	
220 225 230	
ggc acg ttc aac gcc gag ctg acc gcc cag ttg agc cag gcc ggc gcc	952
Gly Thr Phe Asn Ala Glu Leu Thr Ala Gln Leu Ser Gln Ala Gly Ala	
235 240 245	
aac gtc att ccg ttg aac atc ccg ctg ctg ctc aag gaa ggc atg gcc	1000
Asn Val Ile Pro Leu Asn Ile Pro Leu Leu Leu Lys Glu Gly Met Ala	
250 255 260 265	
aac ccg gct tcc ttc ggc ctg gcc gcc gac cag aac ctg atc ggc acc	1048
Asn Pro Ala Ser Phe Gly Leu Ala Ala Asp Gln Asn Leu Ile Gly Thr	
270 275 280	
tgt ttc agc ggc aac ggc tgc acc atg aac ccg acc tac ggg atc aac	1096
Cys Phe Ser Gly Asn Gly Cys Thr Met Asn Pro Thr Tyr Gly Ile Asn	
285 290 295	
ggc agc acg ccc gac ccg agc aaa ttg ctg ttc aac gac agc gtg cac	1144
Gly Ser Thr Pro Asp Pro Ser Lys Leu Leu Phe Asn Asp Ser Val His	
300 305 310	
ccg acc atc acc ggc cag cgc ctg atc gcc gac tac acc tat tgc ctg	1192
Pro Thr Ile Thr Gly Gln Arg Leu Ile Ala Asp Tyr Thr Tyr Ser Leu	
315 320 325	
ctg tgc gcg ccc tgg gag ctg acc ctg ctg ccg gaa atg gcc cac ggc	1240

3/7

Leu	Ser	Ala	Pro	Trp	Glu	Leu	Thr	Leu	Leu	Pro	Glu	Met	Ala	His	Gly	
330					335					340					345	
acc	ctg	cgt	gcc	tac	cag	gac	gaa	ctg	cgc	agc	cag	tgg	cag	gcg	gac	1288
Thr	Leu	Arg	Ala	Tyr	Gln	Asp	Glu	Leu	Arg	Ser	Gln	Trp	Gln	Ala	Asp	
				350					355					360		
tgg	gag	aac	tgg	cag	aac	gtc	ggc	cag	tgg	cgc	ggc	ttc	gtc	ggc	ggc	1336
Trp	Glu	Asn	Trp	Gln	Asn	Val	Gly	Gln	Trp	Arg	Gly	Phe	Val	Gly	Gly	
			365				370						375			
ggg	ggc	cag	cgc	ctg	gac	ttc	gac	tcc	cag	gac	agc	gcc	gcc	agc	ggc	1384
Gly	Gly	Gln	Arg	Leu	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln	Asp	Ser	Ala	Ala	Ser	Gly	
		380					385					390				
gac	ggc	aac	ggc	tac	aac	ctg	acc	ctt	ggg	ggc	agc	tac	cgc	atc	gac	1432
Asp	Gly	Asn	Gly	Tyr	Asn	Leu	Thr	Leu	Gly	Gly	Ser	Tyr	Arg	Ile	Asp	
	395					400					405					
gag	gcc	tgg	cgc	gcc	ggg	gtc	gcc	gcc	ggg	ttc	tac	cgg	cag	aag	ctg	1480
Glu	Ala	Trp	Arg	Ala	Gly	Val	Ala	Ala	Gly	Phe	Tyr	Arg	Gln	Lys	Leu	
410					415					420					425	
gaa	gcc	ggc	gcc	aag	gat	tcc	gac	tac	cgg	atg	aac	agc	tac	atg	gcc	1528
Glu	Ala	Gly	Ala	Lys	Asp	Ser	Asp	Tyr	Arg	Met	Asn	Ser	Tyr	Met	Ala	
				430					435					440		
agc	gcc	ttc	gtg	cag	tac	cag	gaa	aac	cgc	tgg	tgg	gcc	gac	gcg	gcg	1576
Ser	Ala	Phe	Val	Gln	Tyr	Gln	Glu	Asn	Arg	Trp	Trp	Ala	Asp	Ala	Ala	
			445				450						455			
ttg	acc	ggc	ggc	tac	ctc	gac	tac	gac	gac	ctg	aag	cgc	aag	ttc	gcc	1624
Leu	Thr	Gly	Gly	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Asp	Asp	Leu	Lys	Arg	Lys	Phe	Ala	
		460					465					470				
ctg	ggc	ggc	ggc	gag	cgc	agc	gag	aaa	ggc	gac	acc	aac	ggc	cac	ctg	1672
Leu	Gly	Gly	Gly	Glu	Arg	Ser	Glu	Lys	Gly	Asp	Thr	Asn	Gly	His	Leu	
	475					480					485					
tgg	gcg	ttc	agc	gcg	cgc	ctg	ggc	tac	gac	atc	gcc	cag	cag	gcc	gac	1720
Trp	Ala	Phe	Ser	Ala	Arg	Leu	Gly	Tyr	Asp	Ile	Ala	Gln	Gln	Ala	Asp	
490					495					500					505	
agt	ccc	tgg	cac	ctg	tcg	ccg	ttc	gtc	agc	gcc	gac	tat	gca	cgg	gtc	1768
Ser	Pro	Trp	His	Leu	Ser	Pro	Phe	Val	Ser	Ala	Asp	Tyr	Ala	Arg	Val	
				510					515					520		
gag	gtc	gac	ggc	tat	tcc	gag	aag	ggc	gcc	agc	gcc	acc	gcg	ctc	gac	1816
Glu	Val	Asp	Gly	Tyr	Ser	Glu	Lys	Gly	Ala	Ser	Ala	Thr	Ala	Leu	Asp	
			525					530					535			
tac	gac	gac	cag	aag	cgc	agc	tcg	aag	cgc	ctg	ggc	gcc	ggc	ctg	caa	1864
Tyr	Asp	Asp	Gln	Lys	Arg	Ser	Ser	Lys	Arg	Leu	Gly	Ala	Gly	Leu	Gln	
			540				545					550				
ggc	aag	tac	gcg	ttc	ggc	agc	gat	acc	cag	ctg	ttc	gcc	gag	tac	gcc	1912
Gly	Lys	Tyr	Ala	Phe	Gly	Ser	Asp	Thr	Gln	Leu	Phe	Ala	Glu	Tyr	Ala	
	555					560					565					
cac	gaa	cgt	gag	tac	gag	gac	gac	acc	cag	gac	ctg	acc	atg	tcc	ctc	1960

4/7

His Glu Arg Glu Tyr Glu Asp Asp Thr Gln Asp Leu Thr Met Ser Leu  
 570 575 580 585

aac agc ctg ccg ggc aat cgc ttc acc ctg gaa ggc tac acc ccg cag 2008  
 Asn Ser Leu Pro Gly Asn Arg Phe Thr Leu Glu Gly Tyr Thr Pro Gln  
 590 595 600

gac cat ctg aac cgc gtc tca ctg ggc ttc agc cag aag ctg gcg ccg 2056  
 Asp His Leu Asn Arg Val Ser Leu Gly Phe Ser Gln Lys Leu Ala Pro  
 605 610 615

gag ctg tcg ctg cgc ggc ggc tac aac tgg cgc aag ggc gag gac gat 2104  
 Glu Leu Ser Leu Arg Gly Gly Tyr Asn Trp Arg Lys Gly Glu Asp Asp  
 620 625 630

acc cag cag agc gtc agc ctg gcg ctg agc ctg gac ttc tgaaacggcg 2153  
 Thr Gln Gln Ser Val Ser Leu Ala Leu Ser Leu Asp Phe  
 635 640 645

gccggcgccc ggtcggcgcc 2173

<210> 2  
 <211> 646  
 <212> PRT  
 <213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 2

Met Ile Arg Met Ala Leu Lys Pro Leu Val Ala Ala Cys Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Thr Ala Pro Gln Ala Ala Pro Ser Pro Tyr Ser Thr Leu  
 20 25 30

Val Val Phe Gly Asp Ser Leu Ser Asp Ala Gly Gln Phe Pro Asp Pro  
 35 40 45

Ala Gly Pro Ala Gly Ser Thr Ser Arg Phe Thr Asn Arg Val Gly Pro  
 50 55 60

Thr Tyr Gln Asn Gly Ser Gly Glu Ile Phe Gly Pro Thr Ala Pro Met  
 65 70 75 80

Leu Leu Gly Asn Gln Leu Gly Ile Ala Pro Gly Asp Leu Ala Ala Ser  
 85 90 95

Thr Ser Pro Val Asn Ala Gln Gln Gly Ile Ala Asp Gly Asn Asn Trp  
 100 105 110

Ala Val Gly Gly Tyr Arg Thr Asp Gln Ile Tyr Asp Ser Ile Thr Ala  
 115 120 125

5/7

Ala	Asn	Gly	Ser	Leu	Ile	Glu	Arg	Asp	Asn	Thr	Leu	Leu	Arg	Ser	Arg
130						135					140				
Asp	Gly	Tyr	Leu	Val	Asp	Arg	Ala	Arg	Gln	Gly	Leu	Gly	Ala	Asp	Pro
145					150					155					160
Asn	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Ile	Thr	Gly	Gly	Gly	Asn	Asp	Phe	Leu	Gln	Gly
				165					170					175	
Arg	Ile	Leu	Asn	Asp	Val	Gln	Ala	Gln	Gln	Ala	Ala	Gly	Arg	Leu	Val
			180					185					190		
Asp	Ser	Val	Gln	Ala	Leu	Gln	Gln	Ala	Gly	Ala	Arg	Tyr	Ile	Val	Val
		195					200					205			
Trp	Leu	Leu	Pro	Asp	Leu	Gly	Leu	Thr	Pro	Ala	Thr	Phe	Gly	Gly	Pro
	210					215					220				
Leu	Gln	Pro	Phe	Ala	Ser	Gln	Leu	Ser	Gly	Thr	Phe	Asn	Ala	Glu	Leu
225					230					235					240
Thr	Ala	Gln	Leu	Ser	Gln	Ala	Gly	Ala	Asn	Val	Ile	Pro	Leu	Asn	Ile
				245					250					255	
Pro	Leu	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	Met	Ala	Asn	Pro	Ala	Ser	Phe	Gly	Leu
			260					265					270		
Ala	Ala	Asp	Gln	Asn	Leu	Ile	Gly	Thr	Cys	Phe	Ser	Gly	Asn	Gly	Cys
		275					280					285			
Thr	Met	Asn	Pro	Thr	Tyr	Gly	Ile	Asn	Gly	Ser	Thr	Pro	Asp	Pro	Ser
	290					295					300				
Lys	Leu	Leu	Phe	Asn	Asp	Ser	Val	His	Pro	Thr	Ile	Thr	Gly	Gln	Arg
305					310					315					320
Leu	Ile	Ala	Asp	Tyr	Thr	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ser	Ala	Pro	Trp	Glu	Leu
				325					330					335	
Thr	Leu	Leu	Pro	Glu	Met	Ala	His	Gly	Thr	Leu	Arg	Ala	Tyr	Gln	Asp
			340					345					350		
Glu	Leu	Arg	Ser	Gln	Trp	Gln	Ala	Asp	Trp	Glu	Asn	Trp	Gln	Asn	Val
		355					360					365			

Gly Gln Trp Arg Gly Phe Val Gly Gly Gly Gly Gln Arg Leu Asp Phe  
 370 375 380

Asp Ser Gln Asp Ser Ala Ala Ser Gly Asp Gly Asn Gly Tyr Asn Leu  
 385 390 395 400

Thr Leu Gly Gly Ser Tyr Arg Ile Asp Glu Ala Trp Arg Ala Gly Val  
 405 410 415

Ala Ala Gly Phe Tyr Arg Gln Lys Leu Glu Ala Gly Ala Lys Asp Ser  
 420 425 430

Asp Tyr Arg Met Asn Ser Tyr Met Ala Ser Ala Phe Val Gln Tyr Gln  
 435 440 445

Glu Asn Arg Trp Trp Ala Asp Ala Ala Leu Thr Gly Gly Tyr Leu Asp  
 450 455 460

Tyr Asp Asp Leu Lys Arg Lys Phe Ala Leu Gly Gly Gly Glu Arg Ser  
 465 470 475 480

Glu Lys Gly Asp Thr Asn Gly His Leu Trp Ala Phe Ser Ala Arg Leu  
 485 490 495

Gly Tyr Asp Ile Ala Gln Gln Ala Asp Ser Pro Trp His Leu Ser Pro  
 500 505 510

Phe Val Ser Ala Asp Tyr Ala Arg Val Glu Val Asp Gly Tyr Ser Glu  
 515 520 525

Lys Gly Ala Ser Ala Thr Ala Leu Asp Tyr Asp Asp Gln Lys Arg Ser  
 530 535 540

Ser Lys Arg Leu Gly Ala Gly Leu Gln Gly Lys Tyr Ala Phe Gly Ser  
 545 550 555 560

Asp Thr Gln Leu Phe Ala Glu Tyr Ala His Glu Arg Glu Tyr Glu Asp  
 565 570 575

Asp Thr Gln Asp Leu Thr Met Ser Leu Asn Ser Leu Pro Gly Asn Arg  
 580 585 590

Phe Thr Leu Glu Gly Tyr Thr Pro Gln Asp His Leu Asn Arg Val Ser  
 595 600 605

Leu Gly Phe Ser Gln Lys Leu Ala Pro Glu Leu Ser Leu Arg Gly Gly  
610 615 620

Tyr Asn Trp Arg Lys Gly Glu Asp Asp Thr Gln Gln Ser Val Ser Leu  
625 630 635 640

Ala Leu Ser Leu Asp Phe  
645



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/012017

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)  
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KLIS F. M.: "REVIEW: CELL WALL ASSEMBLY IN YEAST" YEAST, CHICHESTER, SUSSEX, GB, vol. 10, 1994, pages 851-869, XP000196331 ISSN: 0749-503X the whole document	16
X	SCHREUDER M.P. ET AL.: "Immobilizing proteins on the surface of yeast cells" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 14, no. 4, April 1996 (1996-04), pages 115-120, XP004035795 ISSN: 0167-7799 the whole document	16



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 March 2005

Date of mailing of the international search report

06/04/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Barz, W

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/012017

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>OLSEN M.J. ET AL.: "FUNCTION-BASED ISOLATION OF NOVEL ENZYMES FROM A LARGE LIBRARY" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, vol. 18, no. 10, October 2000 (2000-10), pages 1071-1074, XP001147401 ISSN: 1087-0156 cited in the application abstract; figure 1</p>	1-16
A	<p>WO 02/34906 A (GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT GÖTTINGEN) 2 May 2002 (2002-05-02) abstract; claims 1,11,12,17 page 12, lines 3-7</p>	1-16
A	<p>MOORE J.C. ET AL.: "DIRECTED EVOLUTION OF A PARA-NITROBENZYL ESTERASE FOR AQUEOUS-ORGANIC SOLVENTS" BIO/TECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, US, vol. 14, no. 4, April 1996 (1996-04), pages 458-467, XP001148071 ISSN: 0733-222X cited in the application abstract</p>	1-16
A	<p>SAMUELSON P. ET AL.: "Display of proteins on bacteria" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 96, no. 2, 26 June 2002 (2002-06-26), pages 129-154, XP002321735 ISSN: 0168-1656 the whole document</p>	1-16
A	<p>OLSEN MARK ET AL: "High-throughput screening of enzyme libraries" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, vol. 11, no. 4, August 2000 (2000-08), pages 331-337, XP002207011 ISSN: 0958-1669 page 335; figure 3</p>	1-16
A	<p>WILHELM S. ET AL.: "A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 181, no. 22, November 1999 (1999-11), pages 6977-6986, XP002321736 ISSN: 0021-9193 abstract</p>	4

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/012017

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>BECKER S. ET AL.: "Ultra-high-throughput screening based on cell-surface display and fluorescence-activated cell sorting for the identification of novel biocatalysts."</p> <p>CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, vol. 15, no. 4, August 2004 (2004-08), pages 323-329, XP002321737 ISSN: 0958-1669 the whole document</p> <p>-----</p>	1-16

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/012017

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0234906	A	02-05-2002	DE	10053224 A1	08-05-2002
			WO	0234906 A2	02-05-2002
			EP	1328628 A2	23-07-2003
			US	2004106118 A1	03-06-2004

---

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KLIS F. M.: "REVIEW: CELL WALL ASSEMBLY IN YEAST" YEAST, CHICHESTER, SUSSEX, GB, Bd. 10, 1994, Seiten 851-869, XP000196331 ISSN: 0749-503X das ganze Dokument	16
X	SCHREUDER M.P. ET AL.: "Immobilizing proteins on the surface of yeast cells" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, Bd. 14, Nr. 4, April 1996 (1996-04), Seiten 115-120, XP004035795 ISSN: 0167-7799 das ganze Dokument	16

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

## \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* -Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. März 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

06/04/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Barz, W

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>OLSEN M.J. ET AL.: "FUNCTION-BASED ISOLATION OF NOVEL ENZYMES FROM A LARGE LIBRARY"</p> <p>NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US,</p> <p>Bd. 18, Nr. 10, Oktober 2000 (2000-10), Seiten 1071-1074, XP001147401 ISSN: 1087-0156 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Abbildung 1</p> <p>-----</p>	1-16
A	<p>WO 02/34906 A (GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT GÖTTINGEN) 2. Mai 2002 (2002-05-02) Zusammenfassung; Ansprüche 1,11,12,17 Seite 12, Zeilen 3-7</p> <p>-----</p>	1-16
A	<p>MOORE J.C. ET AL.: "DIRECTED EVOLUTION OF A PARA-NITROBENZYL ESTERASE FOR AQUEOUS-ORGANIC SOLVENTS"</p> <p>BIO/TECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, US,</p> <p>Bd. 14, Nr. 4, April 1996 (1996-04), Seiten 458-467, XP001148071 ISSN: 0733-222X in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung</p> <p>-----</p>	1-16
A	<p>SAMUELSON P. ET AL.: "Display of proteins on bacteria"</p> <p>JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 96, Nr. 2, 26. Juni 2002 (2002-06-26), Seiten 129-154, XP002321735 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-16
A	<p>OLSEN MARK ET AL: "High-throughput screening of enzyme libraries"</p> <p>CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, Bd. 11, Nr. 4, August 2000 (2000-08), Seiten 331-337, XP002207011 ISSN: 0958-1669 Seite 335; Abbildung 3</p> <p>-----</p>	1-16
A	<p>WILHELM S. ET AL.: "A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa"</p> <p>JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 181, Nr. 22, November 1999 (1999-11), Seiten 6977-6986, XP002321736 ISSN: 0021-9193 Zusammenfassung</p> <p>-----</p>	4
	-/--	

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	BECKER S. ET AL.: "Ultra-high-throughput screening based on cell-surface display and fluorescence-activated cell sorting for the identification of novel biocatalysts." CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, Bd. 15, Nr. 4, August 2004 (2004-08), Seiten 323-329, XP002321737 ISSN: 0958-1669 das ganze Dokument -----	1-16

**INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/012017

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0234906	A	02-05-2002	DE	10053224 A1	08-05-2002
			WO	0234906 A2	02-05-2002
			EP	1328628 A2	23-07-2003
			US	2004106118 A1	03-06-2004
<hr/>					



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

### **IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**